

30.10.03

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 2 年 1 0 月 3 0 日  
Date of Application:

出 願 番 号                      特 願 2 0 0 2 - 3 1 6 8 9 2  
Application Number:  
[ST. 10/C]:                      [ J P 2 0 0 2 - 3 1 6 8 9 2 ]

出 願 人                      石 原 産 業 株 式 会 社  
Applicant(s):

RECEIVED

19 DEC 2003

WIPO

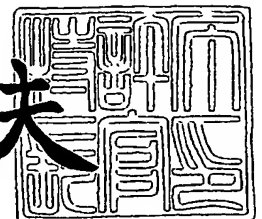
PCT

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 1 2 月    4 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 P-02NI402

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 31/44

【発明者】

    【住所又は居所】 奈良県橿原市縄手町 1 8 9 番地の 3

    【氏名】 木梨 達雄

【発明者】

    【住所又は居所】 滋賀県草津市西渋川二丁目 3 番 1 号 石原産業株式会社  
                        中央研究所内

    【氏名】 四釜 洋

【特許出願人】

    【識別番号】 000000354

    【氏名又は名称】 石原産業株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100097582

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 水野 昭宣

    【電話番号】 5456-0480

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 040408

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 p30・Rap1相互作用制御

【特許請求の範囲】

【請求項1】 Rap1とp30との結合を阻害する化合物を同定する方法であって、Rap1とp30とが結合する条件下で、スクリーニングの対象化合物を共存させ、これらの分子の結合を干渉するかどうかを評価するもので、

(1) Rap1を活性化型にするステップ

(2) 活性化型Rap1とp30とが接触するステップ

(3) 前記活性化型Rap1とp30との共存物にスクリーニングの対象である化合物が接触するステップ

を含むことを特徴とする方法。

【請求項2】 Rap1のN-末端側を GSH (glutathione-S-transferase)と融合させた蛋白質(GST-Rap1)とp30分子を検出するためのエピトープを付加されたp30とを用いることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】 Rap1のN-末端側を GSH (glutathione-S-transferase)と融合させた蛋白質(GST-Rap1)とp30分子を検出するためのMycエピトープを付加されたタンパク質 (Myc-p30) とを用いることを特徴とする請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 Rap1のN-末端側を GSH (glutathione-S-transferase)と融合させた蛋白質(GST-Rap1)が予め担体に固定されていることを特徴とする請求項1～3のいずれか一記載の方法。

【請求項5】 請求項1に記載の方法を用いて同定されるRap1とp30との結合を阻害する化合物。

【請求項6】 請求項1に記載の方法を用いて同定されるRap1とp30との結合を阻害する化合物を有効成分とし、

- (a) 炎症疾患、
- (b) 自己免疫疾患、
- (c) 臓器移植時の拒絶反応、及び
- (d) 癌

から成る群から選ばれたものを処置するためのものであることを特徴とする処置組成物。

【請求項 7】 p30を認識するモノクローナル抗体。

【請求項 8】 p30に対して細胞内で優勢抑制型に機能するポリペプチド又はその塩。

【請求項 9】 請求項 8 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

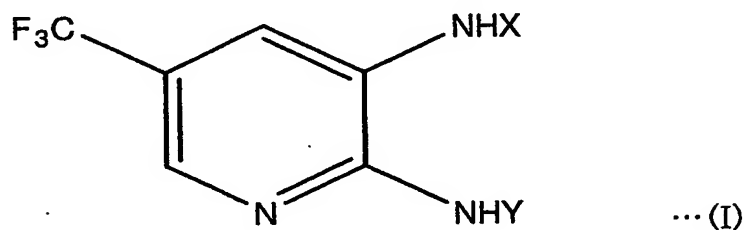
【請求項 10】 請求項 9 に記載のポリヌクレオチドを用い、

- (a) 炎症疾患、
- (b) 自己免疫疾患、
- (c) 臓器移植時の拒絶反応、及び
- (d) 癌

から成る群から選ばれたものを処置するためのものであることを特徴とする処置組成物。

【請求項 11】 式 (I)

【化 1】



[式中、Xが $-CW^1R^1$ 基又は $-C(=W^1)W^2R^2$ 基であり、 $R^1$ がアルキル基、ハロアルキル基、アルコキシカルボニルアルキル基、アルケニル基、ハロアルケニル基、チエニル基で置換されたアルケニル基、シクロアルキル基、ハロゲン原子で置換されたシクロアルキル基、フェニル基、ハロゲン原子で置換されたフェニル基、アルキル基若しくはハロアルキル基で置換されたフェニル基、アルコキシ基若しくはハロアルコキシ基で置換されたフェニル基、テトラヒドロナフチル基、インダニル基、フラニル基又はチエニル基であり、 $R^2$ がアルキル基又は



ハロアルキル基であり、 $W^1$ 及び $W^2$ はそれぞれ独立して、酸素原子又は硫黄原子であり、 $Y$ が $-SO_2R^9$ 基であり、 $R^9$ がアルキル基、ハロアルキル基、フェニル基、ハロゲン原子で置換されたフェニル基、アルキル基若しくはハロアルキル基で置換されたフェニル基又はアルコキシ基若しくはハロアルコキシ基で置換されたフェニル基である]で表される化合物又はその塩を有効成分とすることを特徴とするRap1とp30の結合阻害剤。

【請求項12】 請求項11において、 $X$ がアルコキシカルボニルアルキルカルボニル基、アルケニルカルボニル基、チエニル基で置換されたアルケニルカルボニル基、シクロアルキルカルボニル基、インダニルカルボニル基、フランカルボニル基、チオフェンカルボニル基、テトラヒドロナフチルカルボニル基又はハロゲン原子若しくはハロアルキル基で置換されてもよいベンゾイル基であり、 $Y$ がアルキルスルホニル基であることを特徴とする請求項11に記載のRap1とp30との結合阻害剤。

【請求項13】 請求項11において、 $X$ がシクロアルキルカルボニル基、フランカルボニル基又はハロゲンで置換されてもよいベンゾイル基であり、 $Y$ がアルキルスルホニル基であることを特徴とする請求項11に記載のRap1とp30との結合阻害剤。

【請求項14】 請求項11において化合物が、 $N-(2-エチルスルホニルアミノ-5-トリフルオロメチル-3-ピリジル)$ シクロヘキサンカルボキサミド、 $N-(2-メチルスルホニルアミノ-5-トリフルオロメチル-3-ピリジル)-4-フルオロベンズアミド$ 、 $N-(2-イソプロピルスルホニルアミノ-5-トリフルオロメチル-3-ピリジル)-3-フルオロベンズアミド$ 、 $N-(2-メチルスルホニルアミノ-5-トリフルオロメチル-3-ピリジル)-2-フランカルボキサミド$ 又は $N-(2-イソプロピルスルホニルアミノ-5-トリフルオロメチル-3-ピリジル)$ シクロペンタンカルボキサミドから成る群から選ばれたものであることを特徴とする請求項11に記載のRap1とp30との結合阻害剤。

【請求項15】  $N-(2-エチルスルホニルアミノ-5-トリフルオロメチル-3-ピリジル)$ シクロヘキサンカルボキサミドまたはその塩が有効成分で

あることを特徴とするRap1とp30との結合阻害剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、p30がRap1と相互作用することにより誘導される生物活性を制御することに関する。本発明は、Rap1とp30との結合を制御、例えば阻害あるいは促進する技術並びにその利用技術に関する。

【0002】

【従来の技術】

低分子量G蛋白質Rap1は従来H-Rasのアンタゴニストとしての機能が報告されていたが、最近、接着分子インテグリンの細胞内制御分子であることが明らかになった。免疫系においてはRap1は免疫細胞で発現しているLFA-1などのb2インテグリンの接着性を正に調節し、白血球と血管内皮細胞との接着や組織での遊走や局在、及び抗原提示細胞との接着に重要な影響を与えている。このようなインテグリン接着制御分子としてのRap1の機能破綻は免疫病である炎症、アレルギー、自己免疫疾患、癌免疫、移植免疫等の病態と密接に関連してくると予想される。また、Rap1によるインテグリン接着性制御に関与する分子として、p30を同定したとの報告もある（非特許文献1）。

【0003】

【非特許文献1】

第31回日本免疫学会学術集会（開催日時 2001年12月11日（火）～13日（木））、大阪国際会議場）及び同予稿集（2001年10月31日発行）

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

Rap1によるインテグリン接着制御のメカニズムを解明することはこれらの免疫病の病態理解や治療法を開発することにつながる。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、鋭意研究の結果、p30がRap1エフェクター分子として機能し、L

FA-1による接着、遊走を正に制御する分子であることを明らかにすることに成功した。この知見に基づき、さらなる研究の結果、本発明に至った。

本発明は、

〔1〕 Rap1とp30 との結合を阻害する化合物を同定する方法であって、Rap1とp30 とが結合する条件下で、スクリーニングの対象化合物を共存させ、これらの分子の結合を干渉するかどうかを評価するもので、

(1) Rap1を活性化型にするステップ

(2) 活性化型Rap1とp30 とを接触するステップ

(3) 前記活性化型Rap1とp30 との共存物にスクリーニングの対象である化合物を接触するステップ

を含むことを特徴とする方法；

〔2〕 Rap1のN-末端側を GSH (glutathione-S-transferase)と融合させた蛋白質(GST-Rap1)とp30 分子を検出するためのエピトープを付加されたp30 とを用いることを特徴とする上記〔1〕記載の方法；

〔3〕 Rap1のN-末端側を GSH (glutathione-S-transferase)と融合させた蛋白質(GST-Rap1)とp30 分子を検出するための Mycエピトープを付加されたタンパク質 (Myc-p30)とを用いることを特徴とする上記〔1〕または〔2〕記載の方法；

〔4〕 Rap1のN-末端側を GSH (glutathione-S-transferase)と融合させた蛋白質(GST-Rap1)が予め担体に固定されていることを特徴とする上記〔1〕～〔3〕のいずれか一記載の方法；

#### 【0006】

〔5〕 上記〔1〕記載の方法を用いて同定されるRap1とp30 との結合を阻害する化合物；

〔6〕 上記〔1〕記載の方法を用いて同定されるRap1とp30 との結合を阻害する化合物を有効成分とし、

(a) 炎症疾患、

(b) 自己免疫疾患、

(c) 臓器移植時の拒絶反応、及び

(d) 癌

から成る群から選ばれたものを処置するためのものであることを特徴とする処置組成物；

〔7〕 p30 を認識するモノクローナル抗体；

〔8〕 p30 に対して細胞内で優勢抑制型に機能するポリペプチド又はその塩；

〔9〕 上記〔8〕記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

〔10〕 上記〔9〕記載のポリヌクレオチドを用い、

(a) 炎症疾患、

(b) 自己免疫疾患、

(c) 臓器移植時の拒絶反応、及び

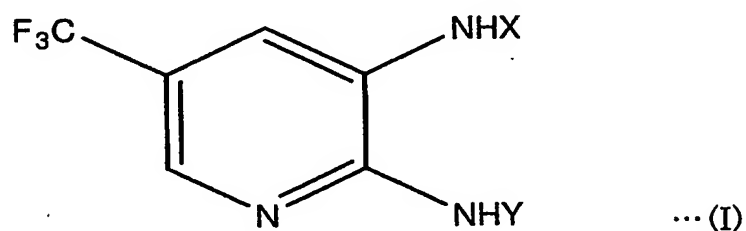
(d) 癌

から成る群から選ばれたものを処置するためのものであることを特徴とする処置組成物；

【0007】

〔11〕 式(I)

【化2】



〔式中、Xが $-CW^1R^1$ 基又は $-C(=W^1)W^2R^2$ 基であり、 $R^1$ がアルキル基、ハロアルキル基、アルコキシカルボニルアルキル基、アルケニル基、ハロアルケニル基、チエニル基で置換されたアルケニル基、シクロアルキル基、ハロゲン原子で置換されたシクロアルキル基、フェニル基、ハロゲン原子で置換されたフェニル基、アルキル基若しくはハロアルキル基で置換されたフェニル基、アルコキシ基若しくはハロアルコキシ基で置換されたフェニル基、テトラヒドロナフチ

ル基、インダニル基、フラニル基又はチエニル基であり、 $R^2$ がアルキル基又はハロアルキル基であり、 $W^1$ 及び $W^2$ はそれぞれ独立して、酸素原子又は硫黄原子であり、 $Y$ が $-SO_2R^9$ 基であり、 $R^9$ がアルキル基、ハロアルキル基、フェニル基、ハロゲン原子で置換されたフェニル基、アルキル基若しくはハロアルキル基で置換されたフェニル基又はアルコキシ基若しくはハロアルコキシ基で置換されたフェニル基である]で表される化合物又はその塩を有効成分とすることを特徴とするRap1とp30の結合阻害剤;

【0008】

〔12〕 上記〔11〕において、 $X$ がアルコシカルボニルアルキルカルボニル基、アルケニルカルボニル基、チエニル基で置換されたアルケニルカルボニル基、シクロアルキルカルボニル基、インダニルカルボニル基、フランカルボニル基、チオフェンカルボニル基、テトラヒドロナフチルカルボニル基又はハロゲン原子若しくはハロアルキル基で置換されてもよいベンゾイル基であり、 $Y$ がアルキルスルホニル基であることを特徴とする上記〔11〕記載のRap1とp30との結合阻害剤;

〔13〕 上記〔11〕において、 $X$ がシクロアルキルカルボニル基、フランカルボニル基又はハロゲンで置換されてもよいベンゾイル基であり、 $Y$ がアルキルスルホニル基であることを特徴とする上記〔11〕記載のRap1とp30との結合阻害剤;

〔14〕 上記〔11〕において化合物が、 $N-(2-エチルスルホニルアミノ-5-トリフルオロメチル-3-ピリジル)$ シクロヘキサンカルボキサミド、 $N-(2-メチルスルホニルアミノ-5-トリフルオロメチル-3-ピリジル)-4-フルオロベンズアミド$ 、 $N-(2-イソプロピルスルホニルアミノ-5-トリフルオロメチル-3-ピリジル)-3-フルオロベンズアミド$ 、 $N-(2-メチルスルホニルアミノ-5-トリフルオロメチル-3-ピリジル)-2-フランカルボキサミド$ 又は $N-(2-イソプロピルスルホニルアミノ-5-トリフルオロメチル-3-ピリジル)$ シクロペンタンカルボキサミドから成る群から選ばれたものであることを特徴とする上記〔11〕記載のRap1とp30との結合阻害剤;及び

〔15〕 N-（2-エチルスルホニルアミノ-5-トリフルオロメチル-3-ピリジル）シクロヘキサンカルボキサミドまたはその塩が有効成分であることを特徴とするRap1とp30との結合阻害剤を提供する。

【0009】

別の態様では、本発明は、

〔16〕 p30とRap1との相互作用を阻害する活性を有する化合物をスクリーニングする方法及び該スクリーニング試薬；

〔17〕 p30の発現により制御される生物活性を調節する活性を有する化合物をスクリーニングする方法及び該スクリーニング試薬；

〔18〕 p30の発現により制御される生物活性が、

- (a) 微小管系の発達あるいは微小管系の発達誘導、
- (b) leading edge及び／又はuropodの形成誘導、
- (c) LFA-1の接着活性の上昇、
- (d) ケモカイン刺激によるT cellの遊走活性の上昇、
- (e) 細胞接着の上昇、
- (f) 細胞遊走の誘起、
- (g) CXCR4及び／又はCD44のredistributionの誘起、
- (h) TCRあるいはケモカインによる極性形成、
- (i) LFA-1のleading edgeでのclustering、
- (j) LFA-1の極性化、
- (k) 微小管系へのp30の局在化、
- (l) leading edgeでのLFA-1のclusteringとp30の共局在化、
- (m) 抗原依存性のT cell-APC間のconjugate形成による接着面へのLFA-1

及びp30の共蓄積、

- (n) インテグリン依存性の遊走能促進、
- (o) T cellの極性形成、及び
- (p) T cellのSMAC形成

から成る群から選ばれたものであることを特徴とする上記〔17〕記載のスクリーニングする方法及び該スクリーニング試薬；

## 【0010】

〔19〕 p30 発現細胞あるいはそれから誘導されたp30 含有物の存在下であって、

- (i) Rap1 活性化剤存在下にスクリーニング対象物を接触せしめること、
- (ii) Rap1 活性化剤非存在下にスクリーニング対象物を接触せしめること

(iii) 上記(i) の試験結果と上記(ii)の試験結果とを比較することを特徴とする上記〔16〕又は〔17〕記載のスクリーニング方法；

〔20〕 p30 と共にRap1が共発現しているものであることを特徴とする上記〔19〕記載のスクリーニング方法；

〔21〕 活性型Rap1の存在下にスクリーニングを行うことを特徴とする上記〔19〕又は〔20〕記載のスクリーニング方法；

〔22〕 p30 とRap1との相互作用を阻害する活性を有する化合物を有効成分として含有することを特徴とする医薬；

## 【0011】

〔23〕 (a) 微小管系の発達あるいは微小管系の発達誘導、

(b) leading edge及び／又はuropodの形成誘導、

(c) LFA-1 の接着活性の上昇、

(d) ケモカイン刺激によるT cell の遊走活性の上昇、

(e) 細胞接着の上昇、

(f) 細胞遊走の誘起、

(g) CXCR4 及び／又はCD44のredistributionの誘起、

(h) TCR あるいはケモカインによる極性形成、

(i) LFA-1 のleading edgeでのclustering、

(j) LFA-1 の極性化、

(k) 微小管系へのp30 の局在化、

(l) leading edgeでのLFA-1 のclusteringとp30 の共局在化、

(m) 抗原依存性のT cell-APC間のconjugate 形成による接着面へのLFA-1 及びp30 の共蓄積、

- (n) インテグリン依存性の遊走能促進、
- (o) T cellの極性形成、及び
- (p) T cellのSMAC形成

から成る群から選ばれた生物活性を阻害する活性を有する化合物を有効成分として含有することを特徴とする上記〔22〕記載の医薬；

〔24〕 p30 の生物活性を制御することを特徴とするp30 制御剤；

〔25〕 p30 のRap1との相互作用を介した活性を制御することを特徴とする上記〔24〕記載のp30 制御剤；

【0012】

〔26〕 上記〔24〕又は〔25〕記載のp30 制御剤を有効成分として含有することを特徴とする医薬；

〔27〕 p30 の生物活性を阻害することを特徴とするp30 阻害剤；

〔28〕 p30 のRap1との相互作用を介した活性を阻害することを特徴とする上記〔27〕記載のp30 阻害剤；

〔29〕 上記〔27〕又は〔28〕記載のp30 阻害剤を有効成分として含有することを特徴とする医薬；

〔30〕 p30 の生物活性を促進することを特徴とするp30 活性化剤；

〔31〕 p30 のRap1との相互作用を介した活性を促進することを特徴とする上記〔30〕記載のp30 活性化剤；

〔32〕 上記〔30〕又は〔31〕記載のp30 活性化剤を有効成分として含有することを特徴とする医薬；

〔33〕 p30 を使用することを特徴とするスクリーニング方法及び該スクリーニング試薬；及び

〔34〕 医薬品のスクリーニングを行うことを特徴とする上記〔33〕記載のスクリーニング方法及び該スクリーニング試薬を提供する。

本発明のその他の目的、特徴、優秀性及びその有する観点は、以下の記載より当業者にとっては明白であろう。しかしながら、以下の記載及び具体的な実施例等の記載を含めた本件明細書の記載は本発明の好ましい態様を示すものであり、説明のためにのみ示されているものであることを理解されたい。本明細書に開示



した本発明の意図及び範囲内で、種々の変化及び／又は改変（あるいは修飾）をなすことは、以下の記載及び本明細書のその他の部分からの知識により、当業者には容易に明らかであろう。本明細書で引用されている全ての特許文献及び参考文献は、説明の目的で引用されているもので、それらは本明細書の一部としてその内容はここに含めて解釈されるべきものである。

### 【0013】

#### 【発明の実施の形態】

本発明は、p30 とRap1、特に活性化型Rap1との結合などの相互作用により、例えばRap1の下流で細胞接着などの生物活性発現に重要な関与が認められたので、こうした現象を利用した技術が提供される。該技術を利用すればp30 とRap1との結合阻害剤をスクリーニングでき、同定された該阻害剤を利用して医薬品開発も可能である。本技術に従えば、p30 とRap1との相互作用を制御することもかとうとなり、また該制御に関与する化合物などを同定でき、様々な生理現象・生物活性現象を研究可能となり、それに関与する医薬品開発ができる。

該技術により、本発明では、Rap1とp30との結合を阻害する化合物を同定する方法が提供される。該同定法は、代表的な場合、Rap1 とp30とが結合する条件下で、スクリーニングの対象化合物を共存させることによりなされる。Rap1 とp30とは、該測定系に同時にあるいは別々に添加されて共存状態とされることもできる。典型的にはRap1 とp30とが共発現している細胞あるいはその抽出物を用いることも可能であるし、遺伝子組換えの技術でリコンビナントタンパク質として得られたものを混合して用いることもできる。該同定法においては、様々な手法でそれを行うことができるが、例えば(1)Rap1 を活性化型にするステップ、(2) 活性化型Rap1とp30とを混合するステップ、(3) 前記混合物にスクリーニングの対象である化合物を混合するステップが含まれるものであってよい。

スクリーニングにおいては、当該生物学的活性（例えば、Rap1とp30との結合に関連した活性など）を測定して、比較する。

### 【0014】

試験試料としては、例えばタンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、植物抽出物、動物などの組織抽出物、細胞抽出物などが挙

げられる。試験試料に使用される試験化合物の例には、好ましくは抗p30 抗体、酵素阻害剤、サイトカイン、各種インヒビター活性を有する化合物、特に合成化合物などを含んでよい。これら化合物は、新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。代表的な候補化合物としては、例えば特開平6-263735号公報に開示の各種ジアミノトリフルオロメチルピリジン誘導体などが挙げられる。該スクリーニングは、通常の結合活性あるいは生物活性の測定法に準じて実施することができ、例えば当該分野で公知の方法などを参考にして行うことができる。また、各種標識、緩衝液系その他適当な試薬等を使用したり、そこで説明した操作等に準じて行うことができる。使用ペプチドなどは、活性化剤で処理したり、その前駆体あるいは潜在型のものを活性型のものに予め変換しておくこともできる。測定は通常Tris-HCl緩衝液、リン酸塩緩衝液などの反応に悪影響を与えないような緩衝液等の中で、例えば、pH約4～約10（好ましくは、pH約6～約8）において行うことができる。これら個々のスクリーニングにあたっては、それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて、本発明の目的にあった測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、Methods in Enzymology, Academic Press 社 (USA)発行〕など参照〕。

本発明の当該p30-Rap1間相互作用に関連した生物学的活性などの機能（例えば、結合活性あるいは細胞接着活性など）を促進する化合物（アゴニスト、あるいは促進剤）又はその塩は、当該相互作用不全症状などの各種の疾病の治療及び／又は予防剤として有用な医薬として使用できる。一方、本発明の当該p30-Rap1間相互作用に関連した生物学的活性などの機能（例えば、結合活性あるいは細胞接着活性など）を阻害する化合物（アンタゴニスト、あるいは阻害剤）又はその塩は、過p30-Rap1間相互作用症に起因した疾患や病気、がん（浸潤・転移を含む）などの各種の疾病の治療及び／又は予防剤などの医薬として使用できる。

#### 【0015】

本発明では、「遺伝子組換え技術」を利用して所定の核酸を単離・配列決定したり、組換え体を作製したり、所定のペプチドを得ることができる。本明細書中使用できる遺伝子組換え技術としては、当該分野で知られたものが挙げられ、例

例えば J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd edition)", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1 to 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); 日本生化学会編、「続生化学実験講座 1、遺伝子研究法II」、東京化学同人 (1986); 日本生化学会編、「新生化学実験講座 2、核酸 III (組換えDNA 技術)」、東京化学同人 (1992); "Methods in Enzymology" シリーズ, Academic Press, New York、例えば R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 68 (Recombinant DNA), Academic Press, New York (1980); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100 (Recombinant DNA, Part B) & 101 (Recombinant DNA, Part C), Academic Press, New York (1983); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 153 (Recombinant DNA, Part D), 154 (Recombinant DNA, Part E) & 155 (Recombinant DNA, Part F), Academic Press, New York (1987); J. H. Miller ed., "Methods in Enzymology", Vol. 204, Academic Press, New York (1991); R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 216 (Recombinant DNA, Part G), Academic Press, New York (1992); R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 217 (Recombinant DNA, Part H) & 218 (Recombinant DNA, Part I), Academic Press, New York (1993); G. M. Attardi et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 260 (Mitochondrial Biogenesis and Genetics, Part A), Academic Press, New York (1995); J. L. Campbell ed., "Methods in Enzymology", Vol. 262 (DNA Replication), Academic Press, New York (1995); G. M. Attardi et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 264 (Mitochondrial Biogenesis and Genetics, Part B), Academic Press, New York (1996); P. M. Conn ed., "Methods in Enzymology", Vol. 302 (Green Fluorescent Protein), Academic Press, New York (1999); S. Weissman ed., "Methods in Enzymology", Vol. 303 (cDNA Preparation and Characterization), Academic Press, New York (1999); J. C. Glorioso et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 306 (Expression of Recombinant Genes in Eukaryotic Systems), Academic Press, New York (1999); M. Ian Phillips ed.,

"Methods in Enzymology", Vol. 313 (Antisense Technology, Part A: General Methods, Methods of Delivery and RNA Studies) & 314 (Antisense Technology, Part B: Applications), Academic Press, New York (1999); J. Thorner et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 326 (Applications of Chimeric Genes and Hybrid Proteins, Part A: Gene Expression and Protein Purification), 327 (Applications of Chimeric Genes and Hybrid Proteins, Part B: Cell Biology and Physiology) & 328 (Applications of Chimeric Genes and Hybrid Proteins, Part C: Protein-Protein Interactions and Genomics), Academic Press, New York (2000) などに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法あるいはそれらと実質的に同様な方法や改変法が挙げられる（それらの中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含められる）。

#### 【0016】

本明細書で用いる用語「ポリペプチド」としては、以下に記載するような如何なるポリペプチドを指すものであってもよい。ポリペプチドの基本的な構造は周知であり、当該技術分野において非常に数多くの参考書及びその他の刊行物に記載がある。こうしたことに鑑み、本明細書で用いる用語「ポリペプチド」は、ペプチド結合又は修飾したペプチド結合により互いに結合しているような2個又はそれ以上のアミノ酸を含む任意のペプチド又は任意のタンパク質を意味する。本明細書で用いる用語「ポリペプチド」としては、当該分野において、例えばペプチド、オリゴペプチドあるいはペプチドオリゴマーとも称せられる短い鎖のもの、及びタンパク質と一般的に言われ、多くの形態のものが知られている長い鎖のものの両方を通常意味してよい。ポリペプチドは、しばしば、通常、天然型アミノ酸（天然に存在しているアミノ酸：あるいは遺伝子でコードされるアミノ酸）と称されるアミノ酸以外のアミノ酸を含有していてもよい。ポリペプチドは、また末端アミノ酸残基を含めて、その多くのアミノ酸残基が翻訳された後にプロセッシング及びその他の改変（あるいは修飾）されるといった天然の工程によるのみならず、当業者に周知の化学的改変技術によっても、上記のポリペプチドはそれが改変（修飾）できることは理解されよう。該ポリペプチドに加えられる改変（修飾）については、多くの形態のものが知られており、それらは当該分野の基

礎的な参考書及びさらに詳細な論文並びに多数の研究文献にも詳しく記載されており、これらは当業者に周知である。幾つかのとりわけ常套的な改変・修飾としては、例えばアルキル化、アシル化、エステル化、アミド化、グリコシル化、脂質結合、硫酸化、リン酸化、グルタミン酸残基の $\gamma$ -カルボキシ化、水酸化及びADP-リボシル化等が挙げられ、例えばT. E. Creighton, *Proteins-Structure and Molecular Properties*, Second Edition, W. H. Freeman and Company, New York, (1993); B.C.Johnson (Ed.), *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, Academic Press, New York, (1983) (Wold, F., "Posttranslational Protein Modifications: Perspective and Prospects", pp.1-12); Seifter et al., "Analysis for Protein Modifications and nonprotein cofactors", *Methods in Enzymology*, 182: 626-646 (1990); Rattan et al., "Protein Synthesis: Posttranslational Modification and Aging", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 663: p.48-62 (1992)等の記載を参照できる。

#### 【0017】

本発明の代表的なp30 タンパク質としては、図1のポリペプチドのアミノ酸配列またはそれと実質的に同等なアミノ酸配列を有するポリペプチドが挙げられ、例えば、該アミノ酸配列のうちの少なくとも5~213個の連続したアミノ酸残基を有し且つRap1結合活性又は優勢抑制型機能あるいは同等の抗原性などといった実質的に同等の生物学的活性を含めた生物学的活性を有するもの、あるいはそれらの特徴を有し且つ図1の各ドメインのいずれか一つと少なくとも50%より高い相同性、あるいは少なくとも60%より高い相同性、あるいは少なくとも70%より高い相同性、あるいは少なくとも80%より高い相同性、あるいは少なくとも90%より高い相同性、あるいは少なくとも95%以上の相同性、あるいは少なくとも98%以上の相同性を有するものなどで、新規なものが挙げられる。

本発明のヒトp30 関連ポリペプチドとしては、図1のアミノ酸配列の全部又は一部を含む連続したアミノ酸残基、あるいは該図1のアミノ酸配列のうちの連続したアミノ酸残基5個以上、好ましくは10個以上、また好ましくは20個以上、さらに好ましくは30個以上、より好ましくは40個以上、また好ましくは50個以上、さらに好ましくは60個以上、もっと好ましくは70個以上、また好ましくは80個以

上、さらに好ましくは90個以上、もっとも好ましくは100 個以上、また好ましくは110 個以上を有するものが挙げられる。本発明のp30 関連ポリペプチドとしては、図1 のアミノ酸配列の一部または全部を有していてもよい（開始コドンに対応するMetを欠いていてもよい）。こうした配列を有するものはすべて包含されてよい。

### 【0018】

本発明で扱うもの及び当該p30 タンパク質又はポリペプチドをコードする核酸は、代表的には図1 で表されるペプチド及びその一部の連続したアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有するもの、あるいは当該塩基配列の少なくともペプチドコード領域により構成される塩基配列を含有するもの（各特徴的なドメインのみをコードするものも包含する）、コード配列に開始コドン（Met をコードするコドン）及び終止コドンを付加したもの、また、該塩基配列がコードするタンパク質と少なくとも50%の相同性を有するアミノ酸配列を持ち且つ図1 などのアミノ酸配列のうちの少なくとも特徴的な連続したアミノ酸残基を有し、尚且つRap1 結合活性又は優勢抑制型機能あるいは同等の抗原性などのそれと実質的に同等の生物学的活性を含めた生物学的活性を有するペプチドをコードするといったそれと同効の塩基配列を含有するものであれば如何なるものであってもよい。

当該タンパク質をコードする核酸は、一本鎖DNA、二本鎖DNA、RNA、DNA:RNA ハイブリッド、合成DNA などの核酸であり、またヒトゲノムDNA、ヒトゲノミックDNA ライブラリー、ヒト組織・細胞由来のcDNA、合成DNA のいずれであってもよい。該当該タンパク質をコードする核酸の塩基配列は、修飾（例えば、付加、除去、置換など）されることもでき、そうした修飾されたものも包含されてよい。さらには、以下説明するように、本発明の核酸は、本発明のペプチドあるいはその一部をコードするものであってよく、好ましいものとしてはDNA が挙げられる。また上記「同効の塩基配列」とは、例えばストリンジェントな条件で当該塩基配列のうちの連続した5 個以上の塩基配列、好ましくは10個以上の塩基配列、より好ましくは15個以上の塩基配列、さらに好ましくは20個以上の塩基配列とハイブリダイズし、当該タンパク質と実質的に同等のアミノ酸配列をコードするものなどが挙げられる。

## 【0019】

機能的に同等なタンパク質を取得・単離する方法の一つの態様としては、タンパク質中のアミノ酸に変異を導入する方法が当業者によく知られている。即ち、当業者であれば、公知の方法により、天然型のタンパク質（例えば、図1に記載のp30 タンパク質）中のアミノ酸を適宜置換、欠失、付加などして、これと同等の機能を有する改変タンパク質を調製することが可能である。また、アミノ酸の変異は自然界において生じることもある。本発明のタンパク質には、このように天然型のタンパク質のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加したアミノ酸配列を有し、天然型のタンパク質と同等の機能を有するタンパク質も含まれる。タンパク質におけるアミノ酸の改変は、通常、全アミノ酸の50アミノ酸以内であり、好ましくは30アミノ酸以内であり、さらに好ましくは10アミノ酸以内であり、さらに好ましくは3アミノ酸以内である。アミノ酸の改変は、例えば、変異や置換であれば「Transformer Site-directed Mutagenesis Kit」や「ExSite PCR-Based Site-directed Mutagenesis Kit」（Clontech社製）を用いて行うことが可能であり、また、欠失であれば「Quantum leap Nested Deletion Kit」（Clontech社製）などを用いて行うことが可能である。

## 【0020】

変異・変換・修飾法としては、日本生化学会編、「続生化学実験講座1、遺伝子研究法 II」、p105（広瀬進）、東京化学同人(1986)；日本生化学会編、「新生化学実験講座2、核酸 III（組換えDNA 技術）」、p233（広瀬進）、東京化学同人(1992)；R. Wu, L. Grossman, ed., "Methods in Enzymology", Vol. 154, p. 350 & p. 367, Academic Press, New York (1987)；R. Wu, L. Grossman, ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100, p. 457 & p. 468, Academic Press, New York (1983)；J. A. Wells et al., Gene, 34: 315, 1985；T. Grundstroem et al., Nucleic Acids Res., 13: 3305, 1985；J. Taylor et al., Nucleic Acids Res., 13: 8765, 1985；R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 155, p. 568, Academic Press, New York (1987)；A. R. Oliphant et al., Gene, 44: 177, 1986 などに記載の方法が挙げられる。例えば合成オリゴヌクレオチドなどを利用する位置指定変異導入法（部位特異的変異導入法）(Zoller et al.,

Nucl. Acids Res., 10: 6487, 1987; Carter et al., Nucl. Acids Res., 13: 4331, 1986), カセット変異導入法 (cassette mutagenesis: Wells et al., Gene, 34: 315, 1985), 制限部位選択変異導入法 (restriction selection mutagenesis: Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London Ser A, 317: 415, 1986), アラニン・スキヤニング法 (Cunningham & Wells, Science, 244: 1081-1085, 1989), PCR 変異導入法, Kunkel法, dNTP[ $\alpha$ S]法 (Eckstein), 亜硫酸や亜硝酸などを用いる領域指定変異導入法等の方法が挙げられる。

#### 【0021】

アミノ酸の置換、欠失、あるいは挿入は、好ましい変化を与えるものであってよく、当該タンパク質を構成するポリペプチドの生理的な特性や化学的な特性に変化を生ぜしめるものであってよい。該置換、欠失、あるいは挿入を施されたポリペプチドは、そうした置換、欠失、あるいは挿入のされていないものと実質的に同一であるとされるものであることもできる。該アミノ酸配列中のアミノ酸の実質的に同一な置換体としては、そのアミノ酸が属するところのクラスのうちの他のアミノ酸類から選ぶことができる。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、トリプトファン、メチオニンなどが挙げられ、極性（中性）としては、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミンなどが挙げられ、陽電荷をもつアミノ酸（塩基性アミノ酸）としては、アルギニン、リジン、ヒスチジンなどが挙げられ、陰電荷をもつアミノ酸（酸性アミノ酸）としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などが挙げられる。場合によっては、システインをセリンに、グリシンをアラニンやロイシンに、あるいはロイシンをアラニン、イソロイシン、バリンなどに置き換えてもよい。

本発明のタンパク質は、化学的な手法でその含有されるアミノ酸残基を修飾することもできるし、ペプチダーゼ、例えばペプシン、キモトリプシン、パパイン、プロメライン、エンドペプチダーゼ、エキソペプチダーゼなどの酵素を用いて修飾したり、部分分解したりしてその誘導体などに行うことができる。

#### 【0022】

対象ペプチドあるいはポリペプチド（又はタンパク質）は、1個以上のアミノ



酸残基が同一性の点で天然のものと異なるもの、1個以上のアミノ酸残基の位置が天然のものと異なるものであってもよい。p30 タンパク質に特有なアミノ酸残基が1個以上（例えば、1～80個、好ましくは1～60個、さらに好ましくは1～40個、さらに好ましくは1～20個、特には1～10個など）欠けている欠失類縁体、特有のアミノ酸残基の1個以上（例えば、1～80個、好ましくは1～60個、さらに好ましくは1～40個、さらに好ましくは1～20個、特には1～10個など）が他の残基で置換されている置換類縁体、1個以上（例えば、1～80個、好ましくは1～60個、さらに好ましくは1～40個、さらに好ましくは1～20個、特には1～10個など）のアミノ酸残基が付加されている付加類縁体も包含する。

天然のタンパク質の特徴であるドメイン構造あるいは基質結合能が維持されていれば、上記のごとき変異体は、全て本発明に包含される。また天然のタンパク質と実質的に同等の一次構造コンフォメーションあるいはその一部を有しているものも含まれてよいと考えられ、さらに天然のものと実質的に同等の生物学的活性を有しているものも含まれてよいと考えられる。さらに天然に生ずる変異体の一つであることもできる。

#### 【0023】

本明細書において、「実質的に同等」とはタンパク質の活性、例えば、結合活性、生理的な活性、生物学的な活性が実質的に同じであることを意味する。さらにまた、その用語の意味の中には、実質的に同質の活性を有する場合を包含してよく、該実質的に同質の活性としては、細胞接着・移動の制御などを挙げることができる。該実質的に同質の活性とは、それらの活性が性質的に同質であることを示し、例えば、生理的に、薬理学的に、あるいは生物学的に同質であることを示す。例えば、結合活性などの活性が、同等（例えば、約0.001～約1000倍、好ましくは約0.01～約100倍、より好ましくは約0.1～約20倍、さらに好ましくは約0.5～約2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的な要素は異なってもよい。

#### 【0024】

当該ペプチド（又はポリペプチド）は、それが遊離型のものとして得られた場合には、それ自体公知の方法あるいはそれに準じた方法で塩に変換することがで

き、またそれらは塩として得られた場合には、それ自体公知の方法あるいはそれに準じた方法で遊離型のものあるいは他の塩に変換することができる。

当該ペプチド（又はポリペプチド）の塩としては、生理的に許容されるものあるいは医薬として許容されるものが好ましいが、これらに限定されない。こうした塩としては、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などの無機酸との塩、例えば酢酸、ギ酸、マレイン酸、フマル酸、コハク酸、クエン酸、酒石酸、リンゴ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸などの有機酸との塩などが挙げられる。さらに該塩としては、アンモニウム塩、例えばエチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、ヒドロキシエチルアミンなどの有機塩基との塩なども挙げられる。

#### 【0025】

また遺伝子組換え法で製造する時に融合タンパク質として発現させ、生体内あるいは生体外で天然の所定の本発明のタンパク質と実質的に同等の生物学的活性を有しているものに変換・加工してもよい。遺伝子工学的に常用される融合産生法を用いることができるが、こうした融合タンパク質はその融合部を利用してアフニティクロマトグラフィーなどで精製することも可能である。こうした融合タンパク質としては、ヒスチジンタグに融合せしめられたもの、あるいは、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -gal)、マルトース結合タンパク (MBP)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、チオレドキシシン (TRX) 又は Cre Recombinase のアミノ酸配列に融合せしめられたものなどが挙げられる。同様に、ポリペプチドは、ヘテロジーニアスなエピトープのタグを付加され、該エピトープに特異的に結合する抗体を用いてのイムノアフニティ・クロマトグラフィーによる精製をなし得るようにすることもできる。より適した実施態様においては、該エピトープタグとしては、例えば AU5, c-Myc, CruzTag 09, CruzTag 22, CruzTag 41, Glu-Glu, HA, Ha.11, KT3, FLAG (registered trademark, Sigma-Aldrich), Omni-probe, S-probe, T7, Lex A, V5, VP16, GAL4, VSV-G などが挙げられる。(Field et al., Molecular and Cellular Biology, 8: pp.2159-2165 (1988); Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5: pp.3610-3616 (1985); Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6): pp.547-553 (1990); Hopp et al., BioTec

hnology, 6: pp.1204-1210 (1988); Martin et al., Science, 255: pp.192-194 (1992); Skinner et al., J. Biol. Chem., 266: pp.15163-15166 (1991); Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: pp.6393-6397 (1990) など)。酵母を利用した two-hybrid 法も利用できる。

#### 【0026】

さらに融合タンパク質としては、検出可能なタンパク質となるようなマーカーを付されたものであることもできる。より好適な実施態様においては、該検出可能なマーカーは、ビオチン/ストレプトアビジン系のBiotin Avi Tag、蛍光を発する物質などであってよい。該蛍光を発する物質としては、オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) などの発光クラゲ由来の緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein: GFP)、それを改変した変異体 (GFP バリエント)、例えば、EGFP (Enhanced-humanized GFP), rsGFP (red-shift GFP), 黄色蛍光タンパク質 (yellow fluorescent protein: YFP), 緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein: GFP), 藍色蛍光タンパク質 (cyan fluorescent protein: CFP), 青色蛍光タンパク質 (blue fluorescent protein: BFP), ウミシイタケ (*Renilla reniformis*) 由来のGFP などが挙げられる (宮脇敦史編、実験医学別冊ポストゲノム時代の実験講座3-GFP とバイオイメージング、羊土社 (2000年))。また、上記融合タグを特異的に認識する抗体 (モノクローナル抗体及びそのフラグメントを含む) を使用して検出を行うこともできる。

#### 【0027】

タンパク質及びその一部のペプチドの合成には、当該ペプチド合成分野で知られた方法、例えば液相合成法、固相合成法などの化学合成法を使用することができる。こうした方法では、例えばタンパク質あるいはペプチド合成用樹脂を用い、適当に保護したアミノ酸を、それ自体公知の各種縮合方法により所望のアミノ酸配列に順次該樹脂上で結合させていく。縮合反応には、好ましくはそれ自体公知の各種活性化試薬を用いるが、そうした試薬としては、例えばジシクロヘキシルカルボジイミドなどカルボジイミド類を好ましく使用できる。生成物が保護基を有する場合には、適宜保護基を除去することにより目的のものを得ることができる。

タンパク質は、当業者に公知の方法により、天然のタンパク質としての他、遺伝子組換え技術を利用して調製した組換えタンパク質として調製することができる。天然のタンパク質は、例えば、調製された組換えタンパク質をマウス、ウサギなどの小動物に免疫して得た抗体を適当な吸着体（CNBr活性化アガロースやトシル活性化アガロース）に結合させてカラムを作製し、得られたカラムを利用して細胞のタンパク質抽出液を精製することにより調製することが可能である。一方、組換えタンパク質は、常法、例えば、当該タンパク質をコードするDNA を適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入し、該形質転換細胞から精製することにより調製することが可能である。

#### 【0028】

組換えタンパク質を生産するために用いられる細胞としては、例えば、植物細胞、大腸菌、酵母などの微生物細胞、動物細胞、昆虫細胞などが挙げられる。また、細胞内で組換えタンパク質を発現させるためのベクターとしては、例えば、植物、酵母細胞用にはプラスミド「pBI121」や「pBI101」（Clontech社製）、大腸菌用にはプラスミド「pET Expression system」（Stratagene社製）や「GST gene fusion Vectors」（Pharmacia 社製）、ほ乳類細胞用にはプラスミド「pMAM」（Clontech社製）、昆虫細胞用にはプラスミド「pBacPAK8.9」（Clontech社製）などが挙げられる。ベクターへのDNA の挿入は、常法、例えば、Molecular Cloning (Maniatis et al., Cold Spring harbor Laboratory Press) に記載の方法により行うことができる。また、宿主細胞へのベクターの導入は、常法により宿主細胞に応じてエレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法などの方法で行うことが可能である。

#### 【0029】

得られた形質転換細胞からの所望の組換えタンパク質の精製は、タンパク質の性質に応じ、塩析や有機溶媒による沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、免疫吸着体によるカラムクロマトグラフィー、ゲルろ過、SDS 電気泳動、等電点電気泳動などを適宜組み合わせて行うことが可能である。また、当該組換えタンパク質をグルタチオンS-トランスフェラーゼなどの標識との融合タンパク質として発現させた場合には、該標識に対するアフィ

ニティークロマトグラフィーなどにより精製することも可能である。

また、本発明は、p30-Rap1結合の制御・結合の解析などに関連して利用されるタンパク質などをコードするDNAを提供する。該DNAは、本発明にしたがった所定のタンパク質をコードし得るものであれば特に制限はなく、ゲノムDNA、cDNA、化学合成DNAなどが含まれる。ゲノムDNAは、当該分野で知られた方法に従って調製したゲノムDNAを鋳型として、所定のDNAの塩基配列（例えば、図1に記載の塩基配列）を基に作製したプライマーを用いてポリメラーゼ・チェーン・リアクション（polymerase chain reaction; PCR）を行うことにより調製することが可能である。また、cDNAであれば、常法（Maniatis et al. Molecular Cloning Cold Spring harbor Laboratory Press）により細胞からmRNAを調製し、逆転写反応を行い、上記と同様のプライマーを用いてPCRを行うことにより調製することが可能である。また、ゲノムDNAやcDNAは、常法によりゲノムDNAライブラリーまたはcDNAライブラリーを作製し、このライブラリーに対し、例えば当該DNAの塩基配列（例えば、図1に記載の塩基配列）を基に合成したプローブを用いてスクリーニングすることによっても調製することが可能である。

#### 【0030】

本明細書中、PCRとは、一般的に、Saiki et al., Science, 239:487(1988); 米国特許第 4,683,195号明細書などに記載されたような方法を指し、例えば、所望のヌクレオチド配列をインビトロで酵素的に増幅するための方法を指している。一般に、PCRは、鋳型核酸と優先的にハイブリダイズすることのできる2個のオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、プライマー伸長合成を行うようなサイクルを繰り返し行うことを含むものである。典型的には、PCR法で用いられるプライマーは、鋳型内部の増幅されるべきヌクレオチド配列に対して相補的なプライマーを使用することができ、例えば、該増幅されるべきヌクレオチド配列とその両端において相補的であるか、あるいは該増幅されるべきヌクレオチド配列に隣接しているものを好ましく使用することができる。代表的な場合には、5'端側のプライマーとしては、少なくとも開始コドンを含むか、あるいは該開始コドンを含めて増幅できるように選択し、また3'端側のプライマーとしては、少なくともストップコドンを含むか、あるいは該ストップコドンを含めて増幅

できるように選択することが好ましい。プライマーは、好ましくは 5 個以上の塩基、さらに好ましくは 10 個以上の塩基からなるオリゴヌクレオチド、より好ましくは 18~35 個の塩基からなるオリゴヌクレオチドが挙げられる。

### 【0031】

PCR は、当該分野で公知の方法あるいはそれと実質的に同様な方法や改変法により行うことができるが、例えば 上記文献の他、R. Saiki, et al., Science, 230: 1350, 1985; H. A. Erlich ed., PCR Technology, Stockton Press, 1989; D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); M. A. Innis et al. ed., "PCR Protocols: a guide to methods and applications", Academic Press, New York (1990)); M. J. McPherson, P. Quirke and G. R. Taylor (Ed.), PCR: a practical approach, IRL Press, Oxford (1991); M. A. Frohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002 (1988) などに記載された方法あるいはそれを修飾したり、改変した方法に従って行うことができる。また、PCR は、それに適した市販のキットを用いて行うことができ、キット製造業者あるいはキット販売業者により明らかにされているプロトコルに従って実施することもできる。

### 【0032】

PCR は、代表的な場合には、例えば鋳型（例えば、mRNAを鋳型にして合成されたDNA; 1st strand DNA など）と該遺伝子に基づいてデザインされたプライマーとを、10×反応緩衝液（Taq DNA ポリメラーゼに添付されている）、dNTPs（デオキシヌクレオシド三リン酸dATP, dGTP, dCTP, dTTPの混合物）、Taq DNA ポリメラーゼ及び脱イオン蒸留水と混合する。混合物を、例えば、GeneAmp 2400 PCR system, Perkin-Elmer/Cetus などの自動サーマルサイクラーを用いて一般的なPCR サイクル条件下にそのサイクルを25~60回繰り返すが、増幅のためのサイクル数は適宜目的に応じて適当な回数とすることができる。PCR サイクル条件としては、例えば、変性90~95℃ 5~100 秒、アニーリング40~60℃ 5~150 秒、伸長65~75℃ 30 ~300 秒のサイクル、好ましくは変性 94 °C 15 秒、アニーリング 58 °C 15 秒、伸長 72 °C 45 秒のサイクルが挙げられるが、アニーリングの反

応温度及び時間は適宜実験によって適当な値を選択できるし、変性反応及び伸長反応の時間も、予想されるPCR産物の鎖長に応じて適当な値を選択できる。アニーリングの反応温度は、通常プライマーと鋳型DNAとのハイブリッドの $T_m$ 値に応じて変えることが好ましい。伸長反応の時間は、通常1000bpの鎖長当たり1分程度がおおよその目安であるが、より短い時間を選択することも場合により可能である。得られたDNAの塩基配列は、例えば「シーケンサーModel310」（ABI社製）を利用することにより容易に決定することが可能である。

### 【0033】

本明細書中、「オリゴヌクレオチド」とは、比較的短い一本鎖又は二本鎖のポリヌクレオチドで、好ましくはポリデオキシヌクレオチドが挙げられ、Angew. Chem., Int. Ed. Engl., Vol.28, p.716-734 (1989)に記載されているような既知の方法、例えば、フォスフォトリエステル法、フォスフォジエステル法、フォスファイト法、フォスフォアミダイト法、フォスフォネート法などの方法により化学合成されることができる。通常合成は、修飾された固体支持体上で合成を便利に行うことができることが知られており、例えば、自動化された合成装置を用いて行うことができ、該装置は市販されている。該オリゴヌクレオチドは、一つ又はそれ以上の修飾された塩基を含有していてよく、例えば、イノシンなどの天然においては普通でない塩基あるいはトリチル化された塩基などを含有していてよいし、場合によっては、マーカの付された塩基を含有していてよい。

### 【0034】

所定の核酸を同定したりするには、ハイブリダイゼーション技術を利用することができる。該ハイブリダイゼーションは、上記「遺伝子組換え技術」を開示する文献記載の方法あるいはそれと実質的に同様な方法や改変法により行うことができる。例えば、ハイブリダイゼーションは、DNAなどの核酸を含有しているサンプルをナイロンフィルターなどの膜を含めた担体に転写せしめ、必要に応じ変成処理、固定化処理、洗浄処理などを施した後、その担体（例えば、膜など）に転写せしめられたものを、必要に応じ変成させた標識プローブDNA断片と、ハイブリダイゼーション用緩衝液中で反応させて行われる。

ハイブリダイゼーション処理は、普通約35～約80℃、より好適には約50～約65

℃で、約15分間～約36時間、より好適には約1～約24時間行われるが、適宜最適な条件を選択して行うことができる。例えば、ハイブリダイゼーション処理は、約55℃で約18時間行われる。ハイブリダイゼーション用緩衝液としては、当該分野で普通に使用されるものの中から選んで用いることができ、例えば、Rapid hybridization buffer (Amersham社) などを用いることができる。転写した担体（例えば、膜など）の変成処理としては、アルカリ変性液を使用する方法が挙げられ、その処理後中和液や緩衝液で処理するのが好ましい。また担体（例えば、膜など）の固定化処理としては、普通約40～約100℃、より好適には約70～約90℃で、約15分間～約24時間、より好適には約1～約4時間ベーキングすることにより行われるが、適宜好ましい条件を選択して行うことができる。例えば、フィルターなどの担体を約80℃で約2時間ベーキングすることにより固定化が行われる。転写した担体（例えば、膜など）の洗浄処理としては、当該分野で普通に使用される洗浄液、例えば1M NaCl、1mM EDTAおよび0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) 含有50mM Tris-HCl緩衝液、pH8.0などで洗うことにより行うことができる。ナイロンフィルターなどの膜を含めた担体としては、当該分野で普通に使用されるものの中から選んで用いることができる。

#### 【0035】

上記アルカリ変性液、中和液、緩衝液としては、当該分野で普通に使用されるものの中から選んで用いることができ、アルカリ変性液としては、例えば、0.5M NaOH および1.5M NaCl を含有する液などを挙げることができ、中和液としては、例えば、1.5M NaCl 含有0.5M Tris-HCl 緩衝液、pH8.0などを挙げることができ、緩衝液としては、例えば、2×SSPE (0.36M NaCl、20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>および2mM EDTA)などを挙げることができる。またハイブリダイゼーション処理に先立ち、非特異的なハイブリダイゼーション反応を防ぐために、必要に応じて転写した担体（例えば、膜など）はプレハイブリダイゼーション処理することが好ましい。このプレハイブリダイゼーション処理は、例えば、プレハイブリダイゼーション溶液 [50% formamide、5×Denhardt's溶液 (0.2% ウシ血清アルブミン、0.2% polyvinyl pyrrolidone)、5×SSPE、0.1% SDS、100 μg/ml 熱変性サケ精子DNA]などに浸し、約35～約50℃、好ましくは約42℃で、約4～約24時間



、好ましくは約 6～約8 時間反応させることにより行うことができるが、こうした条件は当業者であれば適宜実験を繰り返し、より好ましい条件を決めることができる。ハイブリダイゼーションに用いる標識プローブDNA 断片の変性は、例えば、約70～約100 ℃、好ましくは約100 ℃で、約1～約60分間、好ましくは約 5 分間加熱するなどして行うことができる。なお、ハイブリダイゼーションは、それ自体公知の方法あるいはそれに準じた方法で行うことができるが、本明細書でストリンジェントな条件とは、例えばナトリウム濃度に関し、約15～約50mM、好ましくは約19～約40mM、より好ましくは約19～約20mMで、温度については約35～約85℃、好ましくは約50～約70℃、より好ましくは約60～約65℃の条件を示す。

ハイブリダイゼーション完了後、フィルターなどの担体を十分に洗浄処理し、特異的なハイブリダイゼーション反応をした標識プローブDNA 断片以外の標識プローブを取り除くなどしてから検出処理をすることができる。フィルターなどの担体の洗浄処理は、当該分野で普通に使用されるものの中から選んで用いて行うことができ、例えば、0.1 % SDS含有 0.5×SSC ( 0.15M NaCl、15mM クエン酸 ) 溶液などで洗うことにより実施できる。

#### 【0036】

ハイブリダイズした核酸は、代表的にはオートラジオグラフィーにより検出することができるが、当該分野で用いられる方法の中から適宜選択して検出に用いることもできる。検出したシグナルに相当する核酸バンドを、適切な緩衝液、例えば、SM溶液(100mM NaCl および10mM MgSO<sub>4</sub>含有50mM Tris-HCl 緩衝液、pH7.5 ) などに懸濁し、ついでこの懸濁液を適度に希釈して、所定の核酸を単離・精製、そしてさらなる増幅処理にかけることができる。

ハイブリダイゼーション処理により遺伝子ライブラリーやcDNAライブラリーなどを含めた核酸サンプルから目的核酸をスクリーニングする処理は、繰り返して行うことができる。クローニングされているヒト由来のcDNAライブラリー、例えば種々のヒト由来の組織あるいは培養細胞（特には、ヒトの腎臓、脳、松果体、下垂体後葉、神経細胞、網膜、網膜血管細胞、網膜神経細胞、胸腺、血管、内皮細胞、血管平滑筋細胞、血液細胞、マクロファージ、リンパ球、精巢、卵巣、子宮、腸、心臓、肝臓、脾臓、小腸、大腸、歯肉関連細胞、皮膚関連細胞、糸球体

細胞、尿細管細胞、結合組織細胞などの組織・細胞、さらには各種腫瘍組織、ガン細胞等) cDNAライブラリーを使用できる。さらに鋳型などとして用いるcDNAライブラリーは、市販の種々の組織由来cDNAライブラリーを直接使用することもでき、例えばStratagene社, Invitrogen社, Clontech社などから市販されたcDNAライブラリーを用いることができる。典型的な例では、ヒト組織・細胞から調製した遺伝子ライブラリー、例えばヒトPl artificial chromosome ゲノミックライブラリー (Human Genome Mapping Resource Center)、ヒト組織cDNAライブラリー (例えば、Clontech社などから入手可能) を用いることができる。種々のヒト組織あるいは培養細胞等から構築されたヒトゲノミック DNAライブラリーあるいはヒト由来cDNAライブラリーをプローブを使用してスクリーニングできる。プローブなどを放射性同位体などによって標識するには、市販の標識キット、例えばランダムプライム DNAラベリングキット (Boehringer Mannheim社) などを使用し、行うことができる。例えば、random-primingキット (Pharmacia LKB社, Uppsala) などを使用して、プローブ用DNA を [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP (Amersham社) などで標識し、放射活性を持つプローブを得ることができる。

#### 【0037】

所定の核酸を保有する、ファージ粒子、組換えプラスミド、組換えベクターなどは、当該分野で普通に使用される方法でそれを精製分離することができ、例えば、グリセロールグラジエント超遠心分離法 (Molecular Cloning, a laboratory manual, ed. T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory, 2nd ed. 78, 1989)、電気泳動法などにより精製することができる。ファージ粒子などからは、当該分野で普通に使用される方法でDNA を精製分離することができ、例えば、得られたファージなどをTM溶液 (10mM MgSO<sub>4</sub>含有50mM Tris-HCl 緩衝液、pH7.8) などに懸濁し、DNase I およびRNase A などで処理後、20mM EDTA、50  $\mu$ g/ml Proteinase K 及び0.5 %SDS 混合液などを加え、約65℃、約1 時間保温した後、これをフェノール抽出ジエチルエーテル抽出後、エタノール沈殿によりDNA を沈殿させ、次に得られたDNA を70%エタノールで洗浄後乾燥し、TE溶液 (10mM EDTA 含有10mM Tris-HCl 緩衝液、pH8.0) に溶解するなどして得られる。また、目的としているDNA は、サブクローニングなどにより大量に得ることも可能であり

、例えばサブクローニングは、宿主として大腸菌を用いプラスミドベクターなどを用いて行うことができる。こうしたサブクローニングにより得られたDNA も、上記と同様にして遠心分離、フェノール抽出、エタノール沈殿などの方法により精製分離できる。

#### 【0038】

本明細書で「高い相同性」といった場合当該対象配列の長さにもよるが、例えば 50%以上、さらには60% 以上、好ましくは70% 以上、さらに好ましくは80% 以上、そして特定の場合には95% 以上で、特に好ましくは97% 以上であってよい。該「同効の塩基配列」とは、例えばストリンジェントな条件で問題の配列を有するものにハイブリダイズするものであってよく、例えば当該塩基配列のうちの連続した5個以上の塩基配列、好ましくは10個以上の塩基配列、より好ましくは15個以上の塩基配列、さらに好ましくは20個以上の塩基配列とハイブリダイズし、当該ポリペプチドと実質的に同等のアミノ酸配列をコードするものなどが挙げられる。核酸は、化学合成によって得ることも可能である。その場合断片を化学合成し、それらを酵素により結合することによってもよい。

#### 【0039】

本明細書において、得られたPCR産物などの核酸(DNAを含む)は、通常 1~2% アガロースゲル電気泳動にかけて、特異なバンドとしてゲルから切り出し、例えば、gene clean kit (Bio 101)などの市販の抽出キットを用いて抽出する。抽出されたDNA は適当な制限酵素で切断し、必要に応じ精製処理したり、さらには必要に応じ5'末端をT4ポリヌクレオチドキナーゼなどによりリン酸化した後、pUC18などのpUC系ベクターといった適当なプラスミドベクターにライゲーションし、適当なコンピテント細胞を形質転換する。クローニングされたPCR産物はその塩基配列を解析される。PCR産物のクローニングには、例えば、p-Direct (Clontech社), pCR-Script™ SK(+) (Stratagene社), pGEM-T (Promega社), pAmp™ (Gibco-BRL社)などの市販のプラスミドベクターを用いることが出来る。宿主細胞の形質転換をするには、例えばファージベクターを使用したり、カルシウム法、ルビジウム／カルシウム法、カルシウム／マンガン法、TFB 高効率法、FSB 凍結コンピテント細胞法、迅速コロニー法、エレクトロポレーションなど当該分野

で知られた方法あるいはそれと実質的に同様な方法で行うことができる (D. Hanahan, J. Mol. Biol., 166: 557, 1983 など)。目的とするDNA を単離するためには、逆転写PCR (polymerase chain reaction coupled reverse transcription ; RT-PCR)、RACE (rapid amplification of cDNA ends) を適用することが出来る。RACEは、例えば、M. A. Innis et al. ed., "PCR Protocols" (M. A. Frohman, "a guide to methods and applications"), pp.28-38, Academic Press, New York (1990) などに記載された方法に従って行うことができる。

#### 【0040】

DNA は、必要に応じてクローニングでき、例えば、プラスミド、 $\lambda$ ファージ、コスミド、P1ファージ、F因子、YAC などが利用できる。好ましくは $\lambda$ ファージ由来のベクターが挙げられ、例えばCharon 4A、Charon 21A、 $\lambda$ gt10、 $\lambda$ gt11、 $\lambda$ DASHII、 $\lambda$ FIXII、 $\lambda$ EMBL3、 $\lambda$ ZAPII<sup>TM</sup> (Stratagene社) などが利用できる。また、得られたDNA を、下記で詳しく説明するような適当なベクター、例えば、プラスミドpEX、pMAMneo、pKG5などのベクターに組込み、下記で詳しく説明するような適当な宿主細胞、例えば、大腸菌、酵母、CHO 細胞、COS 細胞などで発現させることができる。また、該DNA 断片は、そのままあるいは適当な制御配列を付加したDNA 断片として、または適当なベクターに組込み、そして動物に導入して、所定の遺伝子を発現するトランスジェニック動物を作成することができる。動物としては、哺乳動物が挙げられ、例えば、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ウシなどが挙げられる。好ましくは、マウスなどの動物の受精卵に該DNA 断片を導入して、トランスジェニック動物を作成することができる。所定の遺伝子産物の確認を、当該外来遺伝子をトランスフェクションした、293T細胞、COS-1 細胞などのそれに適した動物細胞などを用いて行うことができる。

外来遺伝子を哺乳動物などの動物細胞に導入する方法としては当該分野で知られた方法あるいはそれと実質的に同様な方法で行うことができ、例えばリン酸カルシウム法 (例えば、F. L. Graham et al., Virology, 52: 456, 1973など)、DEAE-デキストラン法 (例えば、D. Warden et al., J. Gen. Virol., 3: 371, 1968など)、エレクトロポレーション法 (例えば、E. Neumann et al., EMBO J, 1: 841, 1982 など)、マイクロインジェクション法、リボソーム法、ウイルス

感染法、ファージ粒子法などが挙げられる。こうして所定の遺伝子をトランスフェクションされた動物細胞の産生する遺伝子産物は、それを解析することもできる。

#### 【0041】

所定の遺伝子など（本発明で得られたDNA など）を組込むプラスミドとしては遺伝子工学的に常用される宿主細胞（例えば、大腸菌、枯草菌等の原核細胞宿主、酵母、293T細胞、CHO 細胞、COS 細胞等の真核細胞宿主、Sf21等の昆虫細胞宿主）中で該DNA が発現できるプラスミドであればどのようなプラスミドでもよい。もちろん、市販のキットや試薬に添付のものから選んで使用することもできる。こうした配列内には、例えば選択した宿主細胞で発現するのに好適に修飾されたコドンが含まれていることができるし、制限酵素部位が設けられていることもできるし、目的とする遺伝子の発現を容易にするための制御配列、促進配列など、目的とする遺伝子を結合するのに役立つリンカー、アダプターなど、さらには抗生物質耐性などを制御したり、代謝を制御したりし、選別などに有用な配列（ハイブリドタンパク質や融合タンパク質をコードするものも含む）等を含んでいることができる。好ましくは、適当なプロモーター、例えば大腸菌を宿主とするプラスミドでは、トリプトファンプロモーター(trp)、ラクトースプロモーター(lac)、トリプトファン・ラクトースプロモーター(tac)、リポプロテインプロモーター(lpp)、 $\lambda$ ファージ P<sub>L</sub> プロモーター等を、動物細胞を宿主とするプラスミドでは、SV40レートプロモーター、MMTV LTRプロモーター、RSV LTR プロモーター、CMV プロモーター、SR $\alpha$ プロモーター等を、酵母を宿主とするプラスミドでは、GAL1、GAL10 プロモーター等を使用し得る。さらにCYC1, HIS3, ADH1, PGK, PHO5, GAPDH, ADC1, TRP1, URA3, LEU2, ENO, TP1, AOX1等の制御系を使用することもできる。

#### 【0042】

所望ポリペプチドをコードするDNA のトランスクリプションを促進するためエンハンサーをベクターに挿入することができ、そうしたエンハンサーとしてはプロモーターに働いてトランスクリプションを促進する作用を持つ、通常約10～100 bpの cis作用を持つエレメントのものが挙げられる。多くのエンハンサーが、

グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 $\alpha$ -フェトプロテイン、インシュリンなどの哺乳動物遺伝子から知られている。代表的には、真核細胞感染性ウイルスから得られるエンハンサーが好適に使用でき、例えばレプリケーションオリジンのレート領域にあるSV40エンハンサー (100-270 bp)、サイトメガロウイルスの初期プロモーターのエンハンサー、ポリオーマのレプリケーションオリジンのレート領域にあるエンハンサー、アデノウイルスのエンハンサーなどの例が挙げられる。また、必要に応じて、宿主にあったシグナル配列を付加することもでき、それらは当業者によく知られているものを使用できる。

#### 【0043】

大腸菌を宿主とするプラスミドとしては、例えばpBR322、pUC18、pUC19、pUC18、pUC119、pSP64、pSP65、pTZ-18R/-18U、pTZ-19R/-19U、pGEM-3、pGEM-4、pGEM-3Z、pGEM-4Z、pGEM-5Zf(-)、pBluescript KST<sup>TM</sup> (Stratagene社) などが挙げられる。大腸菌での発現に適したプラスミドベクターとしては、例えばpAS、pKK223 (Pharmacia社)、pMC1403、pMC931、pKC30、pRSET-B (Invitrogen社) なども挙げられる。動物細胞を宿主とするプラスミドとしては、例えばSV40ベクター、ポリオーマ・ウイルスベクター、ワクシニア・ウイルスベクター、レトロウイルスベクターなどが挙げられ、具体的にはpcD、pcD-SR $\alpha$ 、CDM8、pCEV4、pME18S、pBC12BI、pSG5 (Stratagene社) などが挙げられる。酵母を宿主とするプラスミドとしては、YIp型ベクター、YEp型ベクター、YRp型ベクター、YCp型ベクターなどが挙げられ、例えばpGPD-2などが挙げられる。宿主細胞としては、宿主細胞が大腸菌の場合、例えば大腸菌K12株に由来するものが挙げられ、例えばNM533、XL1-Blue、C600、DH1、DH5、DH11S、DH12S、DH5 $\alpha$ 、DH10B、HB101、MC1061、JM109、STBL2、B834株由来としては、BL21(DE3)pLysSなどが挙げられる。宿主細胞が酵母の場合、例えば *Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Pichia pastoris*、*Kluyveromyces* 株、*Candida*、*Trichoderma reesia*、その他の酵母株などが挙げられる。

#### 【0044】

宿主細胞が動物細胞の場合、例えばアフリカミドリザル線維芽細胞由来のCOS-7細胞、COS-1細胞、CV-1細胞、ヒト腎細胞由来293細胞、ヒト表皮細胞由来A4

31細胞、ヒト結腸由来 205細胞、マウス線維芽細胞由来のCOP 細胞、MOP 細胞、WOP 細胞、チャイニーズ・ハムスター細胞由来のCHO 細胞、CHO DHFR<sup>-</sup> 細胞、ヒトHeLa細胞、マウス細胞由来C127細胞、マウス細胞由来NIH 3T3 細胞、マウスL細胞、9BHK、HL-60、U937、HaK、Jurkat細胞、その他の形質転換されて得られたセルライン、通常の二倍体細胞、インビトロの一次培養組織から誘導された細胞株などが挙げられる。昆虫細胞としては、カイコ核多角体病ウイルス (*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus)、それに由来するものあるいはその他の適切なものをベクターとし、*Spodoptera frugiperda* (caterpillar), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (fruit fly), カイコ幼虫あるいはカイコ培養細胞、例えばBM-N細胞などを用いることが挙げられる (例えば、Luckow et al., *Bio/Technology*, 6, 47-55 (1988); Setlow, J. K. et al. (eds.), *Genetic Engineering*, Vol. 8, pp.277-279, Plenum Publishing, 1986; Maeda et al., *Nature*, 315, pp.592-594 (1985))。 *Agrobacterium tumefaciens*などを利用して、植物細胞を宿主細胞として使用することも可能であり、それに適するベクターと共に、それらは当該分野で広く知られている。本発明の遺伝子工学的手法においては、当該分野で知られたあるいは汎用されている制限酵素、逆転写酵素、DNA断片をクローン化するのに適した構造に修飾したりあるいは変換するための酵素であるDNA修飾・分解酵素、DNAポリメラーゼ、末端ヌクレオチジルトランスフェラーゼ、DNAリガーゼなどを用いることが出来る。制限酵素としては、例えば、R. J. Roberts, *Nucleic Acids Res.*, 13: r165, 1985; S. Linn et al. ed. *Nucleases*, p. 109, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York, 1982; R. J. Roberts, D. Macelis, *Nucleic Acids Res.*, 19: Suppl. 2077, 1991などに記載のものが挙げられる。

#### 【0045】

本発明に従い、ポリペプチド (又はタンパク質) をコードする核酸を含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体は、必要に応じて適当な選択マーカーを用い、繰り返しクローニングを行うことにより、高い発現能を安定して有する細胞株を得ることができる。例えば、宿主細胞として動物細胞を用いた形質転換体において、dhfr遺伝子を選択マーカーとして利用した場合、MTX濃度を徐々に

上げて培養し、耐性株を選択することにより、本発明のポリペプチドをコードするDNAを増幅させ、より高い発現を得られる細胞株を得ることができる。本発明の形質転換体は、本発明のポリペプチドをコードする核酸が発現可能な条件下で培養し、目的物を生成、蓄積せしめることができる。該形質転換体は、当該分野で汎用されている培地中で培養することができる。例えば、大腸菌、枯草菌等の原核細胞宿主、酵母などを宿主としている形質転換体は、液体培地を好適に使用することができる。培地中には、該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、たとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、麦芽エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム、炭酸カルシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、カザミノ酸、生長促進因子などを添加してもよい。また、必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、 $3\beta$ -インドリル アクリル酸のような薬剤を加えることができる。培地のpHは約5～約8が望ましい。

#### 【0046】

培養は、例えば大腸菌では通常約15～約45℃で約3～約75時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえば約5～約20%の胎児牛血清を含むMEM培地、PRMI1640培地、DMEM培地などが用いられる。pHは約6～約8であるのが好ましい。培養は通常約30～約40℃で約15～約72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。所定の遺伝子産物を発現している形質転換体はそのまま利用可能であるが、その細胞ホモジュネートとしても利用できるが、所定の遺伝子産物を単離して用いることもできる。上記培養細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により粗抽出液を得る方法などを適宜用いることができる。緩衝液の中には尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や、トリトン X-100（商品名



)、ツウィーン-20 (商品名) などの界面活性剤を加えてあってもよい。培養液中に目的生成物が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

#### 【0047】

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる目的生成物は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせてその精製を行なうことができ、例えば硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過法、例えばジエチルアミノエチル基あるいはカルボキシメチル基などを持つ担体などを用いたイオン交換クロマトグラフィー法、例えばブチル基、オクチル基、フェニル基など疎水性基を持つ担体などを用いた疎水性クロマトグラフィー法、色素ゲルクロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外ろ過法、アフィニティー・クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法などにより精製して得ることができる。好ましくは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、リガンドなどを固定化したアフィニティー・クロマトグラフィーなどで処理し精製分離処理できる。例えば、ゼラチン-アガロース・アフィニティー・クロマトグラフィー、ヘパリン-アガロース・クロマトグラフィーなどが挙げられる。得られたタンパク質 (ペプチドあるいはポリペプチドを包含している) は、それを酵素免疫測定法など知られた手法で、適当な担体あるいは固相に結合せしめて固相化することができる。固相化タンパク質、固相化ペプチドは、便利に結合アッセイや物質のスクリーニングに使用できる。

#### 【0048】

本明細書中で開示した関連したタンパク質、そのフラグメント、さらにはDNAを含めた核酸(mRNA やオリゴヌクレオチドを含む) は、それらを単独あるいは有機的に使用し、更にはアンチセンス技術、モノクローナル抗体を含めた抗体、トランスジェニック動物などとも適宜組合わせて、ゲノミックス及びプロテオミックス技術に応用できる。また、二本鎖RNA (dsRNA) を使用してのRNAi (RNA interference) 技術への応用の途もある。かくして、一塩基多型(SNP; single nucleotide polymorphisms)を中心とした遺伝子多型解析、核酸アレイ、タンパク質アレイを使用した遺伝子発現解析、遺伝子機能解析、タンパク質間相互作用解析、

関連遺伝子解析、農薬解析をすることが可能となる。例えば、核酸アレイ技術では、cDNAライブラリーを使用したり、PCR 技術で得たDNA を基板上にスポットティング装置で高密度に配置して、ハイブリダイゼーションを利用して試料の解析が行われる。

#### 【0049】

該アレイ化は、針あるいはピンを使用して、あるいはインクジェットプリンティング技術などでもって、スライドガラス、シリコン板、プラスチックプレートなどの基板のそれぞれ固有の位置にDNA が付着せしめられることによりそれを実施することができる。該核酸アレイ上でのハイブリダイゼーションの結果得られるシグナルを観察してデータを取得する。該シグナルは、蛍光色素などの標識（例えば、Cy3, Cy5, BODIPY, FITC, Alexa Fluor dyes (商品名), Texas red (商品名) など) より得られるものであってよい。検知にはレーザースキャナーなどを利用することもでき、得られたデータは適当なアルゴリズムに従ったプログラムを備えたコンピューターシステムで処理されてよい。また、タンパク質アレイ技術では、タグを付された組換え発現タンパク質産物を利用してよく、二次元電気泳動(2-DE)、酵素消化フラグメントを含めての質量分析 (MS) (これにはエレクトロスプレーイオン化法(electrospray ionization: ESI), マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(matrix-assisted laser desorption/ionization: MALDI)などの技術が含まれ、MALDI-TOF 分析計、ESI-3 連四重極分析計、ESI-イオントラップ分析計などを使用してよい)、染色技術、同位体標識及び解析、画像処理技術などが利用されることが出来る。したがって、本発明には上記p30 及びその関連類縁体・誘導体など及びそれに対する抗体に関連したソフトウェア、データベースなども含まれてよい。

#### 【0050】

所定のDNA (例えば、p30あるいはRap1をコードするDNA)を対象動物に転移させるにあたっては、それをDNA 断片としてあるいは該DNA を動物細胞で発現させるプロモーターの下流に結合して用いるのが一般に有利である。たとえば、マウスに当該DNA を導入する場合、これと相同性が高い動物由来の当該DNA を動物細胞で発現させる各種プロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトを

、対象動物の受精卵、たとえばマウス受精卵へマイクロインジェクションすることによってそのタンパク質を高産生する遺伝子導入（トランスジェニック）マウスを作出できる。マウスとしては、特に純系のマウスに限定されないが、例えば、C57BL/6、Balb/C、C3H、(C57BL/6×DBA/2)F<sub>1</sub>(BDF<sub>1</sub>)などが挙げられる。このプロモーターとしては、例えばウイルス由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビキタスな発現プロモーターなどが好ましく使用しうる。また該DNAを導入する場合、組換えレトロウイルスに組み換えて、それを用いて行うこともできる。好適には対象DNAを導入されたマウス受精卵は、例えば、ICRのような仮親のマウスを使用して生育せしめることができる。

受精卵細胞段階における当該DNA（例えば、p30あるいはRap1をコードするDNA）の転移は、対象動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において当該タンパク質をコードするDNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに該タンパク質をコードするDNAを有することを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てにおいて、該タンパク質を発現できる可能性を有している。

#### 【0051】

該DNA導入動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。さらに、目的DNAを保有する雌雄の動物を交配することにより、導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。該DNAが導入された動物は、該タンパク質が高発現させられているので、該タンパク質に対する阻害剤（インヒビター）のスクリーニング用の動物などとして有用である。また当該遺伝子の発現を阻害することのできるアンチセンスオリゴヌクレオチド、例えば、アンチセンスDNAなどのスクリーニング用の動物などとして有用である。

この遺伝子導入動物を、組織培養のための細胞源として使用することもできる。例えば、遺伝子導入マウスの組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するかある。

いは遺伝子により発現されたタンパク質・組織を分析することにより、例えばp30に関連したタンパク質について分析することができる。該タンパク質を産生する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、たとえば脳、胸腺、血管内皮細胞などの血管細胞、血液細胞、精巣、脳、腸、腎臓やその他の組織由来の細胞についてその機能を研究することができる。また、その細胞を用いることにより、たとえば各種組織の機能を高めるような医薬開発に資することも可能である。また、高発現細胞株があれば、そこから、当該タンパク質を単離精製することも可能である。トランスジェニック マウスなどに関連した技術は、例えば、Brinster, R. L., et al.,; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 4438, 1985; Costantini, F. & Jaenisch, R. (eds.): Genetic manipulation of the early mammalian embryo, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985 などの文献に記載の方法あるいはそこに引用された文献に記載の方法、さらにはそれらの改変法により行うことができる。

#### 【0052】

所定の遺伝子（例えば、p30 やRap1に相当するマウスタンパク質をコードするDNA）に変異をもち、マウスの当該タンパク質を全く発現しない変異マウス（ノックアウトマウス）を作出することができる。たとえば、該遺伝子の翻訳開始コドンの前後4kbを含むおよそ8kbのゲノムDNAの中央近傍に位置し翻訳開始コドンに近いエクソンにneo 耐性遺伝子-polyA付加シグナルからなる遺伝子カセットを挿入した変異遺伝子を持つターゲティングベクターを構築することができる。挿入する遺伝子カセットはneo 耐性遺伝子カセット以外にDT-Aカセット、tkカセット、lacZカセットなどが挙げられる。ターゲティングベクターを直鎖状に開き、樹立したマウス胚性幹細胞（embryonic stem cells: ES細胞）にエレクトロポレーションで導入、さらに培養してneo 耐性を獲得したES細胞を選別する。ES細胞は129、C57BL/6、F1(C57BL/6×CBA)マウスなどのマウス系統から選択して調製することができる。neo 耐性を獲得したES細胞は、マウスの当該遺伝子領域において遺伝子カセットを挿入したターゲティングベクターと相同組換えを起こしていると想定され、少なくともマウスの該遺伝子アレルのうち一つは破壊され、マウスの該タンパク質を正常に発現できなくなる。選別には挿入した遺伝子カセッ

トによりそれぞれ適当な方法が選択され、また、変異の導入はPCR、サザンハイブリダイゼーションあるいはノーザンハイブリダイゼーションなどの方法を用いて確認することができる。

#### 【0053】

変異を導入したES細胞は、C57BL/6、BALB/c、ICR マウスなどから取り出した8細胞期胚に注入、1日培養し胚盤胞に発生したものをICRのような仮親に移植することで個体まで生育させることができる。生まれる子マウスは変異をもつES細胞と正常な宿主胚に由来するキメラマウスで、ES細胞に由来する細胞がどの程度含まれるかは個体の毛色で判断する。従って、ES細胞と宿主胚は毛色の異なった系統の組合わせが望ましい。得られたキメラマウスの変異はヘテロであり、これらを適宜交配することでホモ変異マウスを得ることができる。このようにして得られたホモ変異マウスは生殖細胞および体細胞の全てにおいて、マウスの当該遺伝子のみが破壊され、マウスの対応タンパク質を全く発現せず、繁殖継代される子孫もまた同様の表現系をもつ。

このノックアウトマウスは正常マウスとの比較において、発生、成長、生殖、老化および死など個体のライフサイクルにおける当該タンパク質の役割や各臓器、組織における該タンパク質の機能を解析するのに有用である。また、p30やRaplの生物活性に関連した医薬品開発にも応用できる。ノックアウトマウスはこれらモデル動物としてだけでなく、組織培養のための細胞源として使用することもでき、細胞レベルでの当該タンパク質（遺伝子）の機能解析などに供することができる。ノックアウトマウス等に関連した技術は、例えば、Mansour, S. L., et al.,; Nature, 336: 348-352, 1988; Joyner, A. L., ed.; Gene targeting, IRL Press, 1993; 相沢慎一, ジーンターゲティングES細胞を用いた変異マウスの作成, 羊土社, 1995などの文献に記載の方法あるいはそこに引用された文献に記載の方法、さらにはそれらの改変法により行うことができる。

#### 【0054】

本明細書中、「抗体」との用語は、広義の意味で使用されるものであってよく、所望のp30タンパク質、その構成ポリペプチド及び関連ペプチド断片に対するモノクローナル抗体の単一のものや各種エピトープに対する特異性を持つ抗体

組成物であってよく、また1価抗体または多価抗体並びにポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を含むものであり、さらに天然型(intact)分子並びにそれらのフラグメント及び誘導体も表すものであり、F(ab')<sub>2</sub>、Fab' 及びFab といったフラグメントを包含し、さらに少なくとも二つの抗原又はエピトープ(epitope)結合部位を有するキメラ抗体若しくは雑種抗体、又は、例えば、クワドローム(quadrome)、トリオーム(triome)などの二重特異性組換え抗体、種間雑種抗体、抗イディオタイプ抗体、さらには化学的に修飾あるいは加工などされてこれらの誘導体と考えられるもの、公知の細胞融合又はハイブリドーマ技術や抗体工学を適用したり、合成あるいは半合成技術を使用して得られた抗体、抗体生成の観点から公知である従来技術を適用したり、DNA 組換え技術を用いて調製される抗体、本明細書で記載し且つ定義する標的抗原物質あるいは標的エピトープに関して中和特性を有したりする抗体又は結合特性を有する抗体を包含してよい。特に好ましい本発明の抗体は、p30 のN 末端側の領域から選択されたポリペプチドを特異的に識別できるものが挙げられる。

#### 【0055】

抗原物質に対して作製されるモノクローナル抗体は、培養中の一連のセルラインにより抗体分子の産生を提供することのできる任意の方法を用いて産生される。修飾語「モノクローナル」とは、実質上均質な抗体の集団から得られているというその抗体の性格を示すものであって、何らかの特定の方法によりその抗体が産生される必要があるとみなしてはならない。個々のモノクローナル抗体は、自然に生ずるかもしれない変異体が僅かな量だけ存在しているかもしれないという以外は、同一であるような抗体の集団を含んでいるものである。モノクローナル抗体は、高い特異性を持ち、それは単一の抗原性をもつサイトに対して向けられているものである。異なった抗原決定基(エピトープ)に対して向けられた種々の抗体を典型的には含んでいる通常の(ポリクローナル)抗体調製物と対比すると、それぞれのモノクローナル抗体は当該抗原上の単一の抗原決定基に対して向けられているものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ培養により合成され、他のイムノグロブリン類の夾雑がないあるいは少ない点でも優れている。モノクローナル抗体は、ハイブリッド抗体及びリコンビ

ナント抗体を含むものである。それらは、所望の生物活性を示す限り、その由来やイムノグロブリンクラスやサブクラスの種別に関わりなく、可変領域ドメインを定常領域ドメインで置き換えたり、あるいは軽鎖を重鎖で置き換えたり、ある種の鎖を別の種の鎖でもって置き換えたり、あるいはヘテロジーニアスなタンパク質と融合せしめたりして得ることができる（例えば、米国特許第4816567号; Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.79-97, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987 など）。

モノクローナル抗体を製造する好適な方法の例には、ハイブリドーマ法 (G. Kohler and C. Milstein, Nature, 256, pp.495-497 (1975)); ヒトB細胞ハイブリドーマ法 (Kozbor et al., Immunology Today, 4, pp.72-79 (1983); Kozbor, J. Immunol., 133, pp.3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63, Marcel Dekker, Inc., New York (1987)); トリオーマ法; EBV-ハイブリドーマ法 (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96 (1985)) (ヒトモノクローナル抗体を産生するための方法); 米国特許第4946778号 (単鎖抗体の産生のための技術) が挙げられる他、抗体に関して以下の文献が挙げられる:

【0056】

S. Biocca et al., EMBO J, 9, pp.101-108 (1990); R.E. Bird et al., Science, 242, pp.423-426 (1988); M.A. Boss et al., Nucl. Acids Res., 12, pp.3791-3806 (1984); J. Bukovsky et al., Hybridoma, 6, pp.219-228 (1987); M. DAINO et al., Anal. Biochem., 166, pp.223-229 (1987); J.S. Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, pp.5879-5883 (1988); P.T. Jones et al., Nature, 321, pp.522-525 (1986); J.J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 121 (Immunochemical Techniques, Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies), Academic Press, New York (1986); S. Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, pp.6851-6855 (1984); V. T. Oi et al., BioTechniques, 4, pp.214-221 (1986); L. Riechmann et al., Nature, 332, pp.323-327 (1988); A. Tramontano et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, pp.6736-6740 (1986); C. Wood et al., Nature, 314, pp.446-4

49 (1985); Nature, 314, pp.452-454 (1985) あるいはそこで引用された文献（それらの中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含まれる）。本発明の抗体は、当該遺伝子発現物の解析、検知などに利用できる他、様々な利用が可能である。

#### 【0057】

例えば、当該モノクローナル抗体は、それらが所望の生物活性を示す限り、重鎖及び／又は軽鎖の一部が特定の種から誘導される又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体の対応配列と同一又はホモログスであるが、一方、鎖の残部は、別の種から誘導される又は別の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体の対応配列と同一又はホモログスである、「キメラ」抗体（免疫グロブリン）を特に包含する（米国特許第4816567号明細書；Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, pp.6851-6855 (1984)）。

以下、モノクローナル抗体を例に挙げて、抗体の作製につき詳しく説明する。

本発明のモノクローナル抗体は、ミエローマ細胞を用いての細胞融合技術（例えば、G. Kohler and C. Milstein, Nature, 256, pp.495-497 (1975)）などを利用して得られたモノクローナル抗体であってよく、例えば次のような工程で作製できる。

1. 免疫原性抗原の調製
2. 免疫原性抗原による動物の免疫
3. ミエローマ細胞（骨髄腫細胞）の調製
4. 抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合
5. ハイブリドーマ（融合細胞）の選択及びモノクローン化
6. モノクローナル抗体の製造

#### 【0058】

1. 免疫原性抗原の調製

抗原としては、上記で記載してあるように、当該p30 ポリペプチド又はそれから誘導された断片を単離したものをを用いることもできるが、決定された当該p30 タンパク質のアミノ酸配列情報を基に、適当なオリゴペプチドを化学合成しそれを抗原として利用することができる。代表的には図1に存在するアミノ酸残基の



うちの連続した少なくとも 5 個のアミノ酸を有するペプチドが挙げられる。例えば特徴的な配列、例えば N-末端側などのアミノ酸配列から適当な部分を選ぶことも挙げられる。

抗原は、そのまま適当なアジュバントと混合して動物を免疫するのに使用できるが、免疫原性コンジュゲートなどにしてもよい。例えば、免疫原として用いる抗原は、当該タンパク質を断片化したもの、あるいはそのアミノ酸配列に基づき特徴的な配列領域を選び、ポリペプチドをデザインして化学合成して得られた合成ポリペプチド断片であってもよい。また、その断片を適当な縮合剤を介して種々の担体タンパク質類と結合させてハプテン-タンパク質の如き免疫原性コンジュゲートとし、これを用いて特定の配列のみと反応できる（あるいは特定の配列のみを認識できる）モノクローナル抗体をデザインするのに用いることもできる。デザインされるポリペプチドには予めシステイン残基などを付加し、免疫原性コンジュゲートの調製を容易にできるようにしておくことができる。担体タンパク質類と結合させるにあたっては、担体タンパク質類はまず活性化されることができる。こうした活性化にあたり活性化結合基を導入することが挙げられる。

活性化結合基としては、(1) 活性化エステルあるいは活性化カルボキシル基、例えばニトロフェニルエステル基、ペンタフルオロフェニルエステル基、1-ベンゾトリアゾールエステル基、N-スクシンイミドエステル基など、(2) 活性化ジチオ基、例えば 2-ピリジルジチオ基などが挙げられる。担体タンパク質類としては、キーホール・リンペット・ヘモシアニン (KLH)、牛血清アルブミン (BSA)、卵白アルブミン、グロブリン、ポリリジンなどのポリペプチド、細菌菌体成分、例えば BCG などが挙げられる。

#### 【0059】

#### 2. 免疫原性抗原による動物の免疫

免疫は、当業者に知られた方法により行うことができ、例えば村松繁、他編、実験生物学講座 14、免疫生物学、丸善株式会社、昭和60年、日本生化学会編、続生化学実験講座 5、免疫生化学研究法、東京化学同人、1986年、日本生化学会編、新生化学実験講座 12、分子免疫学 III、抗原・抗体・補体、東京化学同人、1992年などに記載の方法に準じて行うことができる。免疫化剤を（必要に応じ

アジュバントと共に) 一回又はそれ以上の回数哺乳動物に注射することにより免疫化される。代表的には、該免疫化剤及び／又はアジュバントを哺乳動物に複数回皮下注射あるいは腹腔内注射することによりなされる。免疫化剤は、上記抗原ペプチドあるいはその関連ペプチド断片を含むものが挙げられる。免疫化剤は、免疫処理される哺乳動物において免疫原性であることの知られているタンパク質(例えば上記担体タンパク質類など)とコンジュゲートを形成せしめて使用してもよい。アジュバントとしては、例えばフロイント完全アジュバント、リビ(Ribi)アジュバント、百日咳ワクチン、BCG、リピッドA、リポソーム、水酸化アルミニウム、シリカなどが挙げられる。免疫は、例えばBALB/cなどのマウス、ハムスター、その他の適当な動物を使用して行われる。抗原の投与量は、例えばマウスに対して約1～約400  $\mu\text{g}$ /動物で、一般には宿主動物の腹腔内や皮下に注射し、以後1～4週間おきに、好ましくは1～2週間ごとに腹腔内、皮下、静脈内あるいは筋肉内に追加免疫を2～10回程度反復して行う。免疫用のマウスとしてはBALB/c系マウスの他、BALB/c系マウスと他系マウスとのF1マウスなどを用いることもできる。必要に応じ、抗体価測定系を調製し、抗体価を測定して動物免疫の程度を確認できる。本発明の抗体は、こうして得られ免疫された動物から得られたものであってよく、例えば、抗血清、ポリクローナル抗体等を包含する。

### 【0060】

#### 3. ミエローマ細胞(骨髓腫細胞)の調製

細胞融合に使用される無限増殖可能株(腫瘍細胞株)としては免疫グロブリンを産生しない細胞株から選ぶことができ、例えば P3-NS-1-Ag4-1 (NS-1, Eur. J. Immunol., 6: 511-519, 1976)、SP-2/0-Ag14 (SP-2, Nature, 276: 269 ~ 270, 1978)、マウスミエローマ MOPC-21セルライン由来のP3-X63-Ag8-U1 (P3U1, Curr. topics Microbiol. Immunol., 81: 1-7, 1978)、P3-X63-Ag8 (X63, Nature, 256: 495-497, 1975)、P3-X63-Ag8-653 (653, J. Immunol., 123: 1548-1550, 1979) などを用いることができる。8-アザグアニン耐性のマウスミエローマ細胞株はダルベッコMEM 培地(DMEM培地)、RPMI-1640 培地などの細胞培地に、例えばペニシリン、アミカシンなどの抗生物質、牛胎児血清(FCS)などを加え、さらに8-アザグアニン(例えば5～45  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を加えた培地で継代されるが、

細胞融合の2～5日前に正常培地で継代して所要数の細胞株を用意することができる。また使用細胞株は、凍結保存株を約37℃で完全に解凍したのち RPMI-1640 培地などの正常培地で3回以上洗浄後、正常培地で培養して所要数の細胞株を用意したものであってもよい。

#### 【0061】

##### 4. 抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合

上記2. の工程に従い免疫された動物、例えばマウスは最終免疫後、2～5日後にその脾臓が摘出され、それから脾細胞懸濁液を得る。脾細胞の他、生体各所のリンパ節細胞を得て、それを細胞融合に使用することもできる。こうして得られた脾細胞懸濁液と上記3. の工程に従い得られたミエローマ細胞株を、例えば最小必須培地(MEM培地)、DMEM培地、RPMI-1640 培地などの細胞培地中に置き、細胞融合剤、例えばポリエチレングリコールを添加する。細胞融合剤としては、この他各種当該分野で知られたものを用いることができ、この様なものとしては不活性化したセンダイウイルス(HVJ: Hemagglutinating Virus of Japan)なども挙げられる。好ましくは、例えば30～60%のポリエチレングリコールを 0.5～2 ml加えることができ、分子量が 1,000～8,000 のポリエチレングリコールを用いることができ、さらに分子量が 1,000～4,000 のポリエチレングリコールがより好ましく使用できる。融合培地中でのポリエチレングリコールの濃度は、例えば30～60%となるようにすることが好ましい。必要に応じ、例えばジメチルスルホキシドなどを少量加え、融合を促進することもできる。融合に使用する脾細胞(リンパ球): ミエローマ細胞株の割合は、例えば 1:1～20:1とすることが挙げられるが、より好ましくは 4:1～7:1 とすることができる。

融合反応を1～10分間行い、次にRPMI-1640 培地などの細胞培地を加える。融合反応処理は複数回行うこともできる。融合反応処理後、遠心などにより細胞を分離した後選択用培地に移す。

#### 【0062】

##### 5. ハイブリドーマ(融合細胞)の選択及びモノクローン化

選択用培地としては、例えばヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む、FCS 含有MEM 培地、RPMI-1640 培地などの培地、所謂 HAT培地が挙げられ

る。選択培地交換の方法は、一般的には培養プレートに分注した容量と等容量を翌日加え、その後1～3日ごとに HAT培地で半量ずつ交換するというように処理することができるが、適宜これに変更を加えて行うこともできる。また融合後8～16日目には、アミノプテリンを除いた、所謂HT培地で1～4日ごとに培地交換をすることができる。フィーダーとして、例えばマウス胸腺細胞を使用することもでき、それが好ましい場合がある。

ハイブリドーマの増殖のさかんな培養ウェルの培養上清を、例えば放射免疫分析(RIA)、酵素免疫分析(ELISA)、蛍光免疫分析(FIA)などの測定系、あるいは蛍光惹起細胞分離装置(FACS)などで、所定の断片ペプチドを抗原として用いたり、あるいは標識抗マウス抗体を用いて目的抗体を測定するなどして、スクリーニングしたりする。

目的抗体を産生しているハイブリドーマをクローニングする。クローニングは、寒天培地中でコロニーをピック・アップするか、あるいは限界希釈法によりなされうる。限界希釈法でより好ましく行うことができる。クローニングは複数回行うことが好ましい。

### 【0063】

#### 6. モノクローナル抗体の製造

得られたハイブリドーマ株は、FCS 含有MEM 培地、RPMI-1640 培地などの適当な増殖用培地中で培養し、その培地上清から所望のモノクローナル抗体を得ることが出来る。大量の抗体を得るためには、ハイブリドーマを腹水化することが挙げられる。この場合ミエローマ細胞由来の動物と同系の組織適合性動物の腹腔内に各ハイブリドーマを移植し、増殖させるか、あるいは例えばヌード・マウスなどに各ハイブリドーマを移植し、増殖させ、該動物の腹水中に産生されたモノクローナル抗体を回収して得ることが出来る。動物はハイブリドーマの移植に先立ち、プリスタン(2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン)などの鉱物油を腹腔内投与しておくことができ、その処理後、ハイブリドーマを増殖させ、腹水を採取することもできる。腹水液はそのまま、あるいは従来公知の方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過法、イオン交換クロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外ろ過法、アフィニティ・クロ

マトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法などにより精製してモノクローナル抗体として用いることができる。好ましくは、モノクローナル抗体を含有する腹水は、硫酸分画した後、DEAE-セファロースの如き、陰イオン交換ゲル及びプロテインAカラムの如きアフィニティ・カラムなどで処理し精製分離処理できる。特に好ましくは抗原又は抗原断片（例えば合成ペプチド、組換え抗原タンパク質あるいはペプチド、抗体が特異的に認識する部位など）を固定化したアフィニティ・クロマトグラフィー、プロテインAを固定化したアフィニティ・クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイト・クロマトグラフィーなどが挙げられる。

#### 【0064】

また、トランスジェニックマウス又はその他の生物、例えば、その他の哺乳動物は、本発明の免疫原ポリペプチド産物に対するヒト化抗体等の抗体を発現するのに用いることができる。

またこうして大量に得られた抗体の配列を決定したり、ハイブリドーマ株から得られた抗体をコードする核酸配列を利用して、遺伝子組換え技術により抗体を作製することも可能である。当該モノクローナル抗体をコードする核酸は、例えばマウス抗体の重鎖や軽鎖をコードしている遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを使用するなどの慣用の手法で単離し配列決定することができる。一旦単離されたDNAは、上記したようにして発現ベクターに入れ、CHO、COSなどの宿主細胞に入れることができる。該DNAは、例えばホモジニアスなマウスの配列に代えて、ヒトの重鎖や軽鎖の定常領域ドメインをコードする配列に置換するなどして修飾することが可能である（Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6581, 1984）。かくして所望の結合特異性を有するキメラ抗体やハイブリッド抗体も調製することが可能である。また、抗体は、下記するような縮合剤を用いることを含めた化学的なタンパク質合成技術を適用して、キメラ抗体やハイブリッド抗体を調製するなどの修飾をすることも可能である。

ヒト化抗体は、当該分野で知られた技術により行うことが可能である（例えば、Jones et al., Nature, 321: pp.522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332: pp.323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239: pp.1534-1536 (

1988))。ヒトモノクローナル抗体も、当該分野で知られた技術により行うことが可能で、ヒトモノクローナル抗体を生産するためのヒトミエローマ細胞やヒト・マウスヘテロミエローマ細胞は当該分野で知られている (Kozbor, J. Immunol., 133, pp.3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63, Marcel Dekker, Inc., New York (1987))。バイスペシフィックな抗体を製造する方法も当該分野で知られている (Millstein et al., Nature, 305: pp.537-539 (1983); W093/08829; Traunecker et al., EMBO J., 10: pp.3655-3659 (1991); Suresh et al., "Methods in Enzymology", Vol. 121, pp.210 (1986))。

#### 【0065】

さらにこれら抗体をトリプシン、パパイン、ペプシンなどの酵素により処理して、場合により還元して得られるFab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> といった抗体フラグメントにして使用してもよい。

抗体は、既知の任意の検定法、例えば競合的結合検定、直接及び間接サンドイッチ検定、及び免疫沈降検定に使用することができる (Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc., 1987))。

抗体を検出可能な原子団にそれぞれコンジュゲートするには、当分野で知られる任意の方法を使用することができ、例えば、David et al., Biochemistry, 13 巻, 1014-1021 頁 (1974); Pain et al, J. Immunol. Meth., 40: pp.219-231 (1981);及び "Methods in Enzymology", Vol. 184, pp.138-163 (1990) により記載の方法が挙げられる。標識物を付与する抗体としては、IgG 画分、更にはペプシン消化後還元して得られる特異的結合部Fab'を用いることができる。これらの場合の標識物の例としては、下記するように酵素 (ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼあるいは $\beta$ -D-ガラクトシダーゼなど)、化学物質、蛍光物質あるいは放射性同位元素などがある。

#### 【0066】

本発明での検知・測定は、イムノ染色、例えば組織あるいは細胞染色、イムノアッセイ、例えば競合型イムノアッセイまたは非競合型イムノアッセイで行うことができ、ラジオイムノアッセイ、ELISA などを用いることができ、B-F分離を

行ってもよいし、あるいは行わないでその測定を行うことができる。好ましくは放射免疫測定法や酵素免疫測定法であり、さらにサンドイッチ型アッセイが挙げられる。例えばサンドイッチ型アッセイでは、一方を本発明の当該タンパク質及びその関連ペプチド断片に対する抗体とし、他方を当該タンパク質のN-末端側残基に対する抗体とし、そして一方を検出可能に標識化する。同じ抗原を認識できる他の抗体を固相に固定化する。検体と標識化抗体及び固相化抗体を必要に応じ順次反応させるためインキュベーション処理し、ここで非結合抗体を分離後、標識物を測定する。測定された標識の量は抗原、すなわち当該ポリペプチド断片抗原の量と比例する。このアッセイでは、不溶化抗体や、標識化抗体の添加の順序に応じて同時サンドイッチ型アッセイ、フォワード (forward) サンドイッチ型アッセイあるいは逆サンドイッチ型アッセイなどと呼ばれる。例えば洗浄、攪拌、震盪、ろ過あるいは抗原の予備抽出等は、特定の状況のもとでそれら測定工程の中で適宜採用される。特定の試薬、緩衝液等の濃度、温度あるいはインキュベーション処理時間などのその他の測定条件は、検体中の抗原の濃度、検体試料の性質等の要素に従い変えることができる。当業者は通常の実験法を用いながら各測定に対して有効な最適の条件を適宜選定して測定を行うことができる。

#### 【0067】

抗原あるいは抗体を固相化できる多くの担体が知られており、本発明ではそれらから適宜選んで用いることができる。担体としては、抗原抗体反応などに使用されるものが種々知られており、本発明においても勿論これらの公知のものの中から選んで使用できる。特に好適に使用されるものとしては、例えばガラス、例えば活性化ガラス、多孔質ガラス、シリカゲル、シリカーアルミナ、アルミナ、磁化鉄、磁化合金などの無機材料、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリメタクリレート、ポリスチレン、スチレンーブタジエン共重合体、ポリアクリルアミド、架橋ポリアクリルアミド、スチレンーメタクリレート共重合体、ポリグリシジルメタクリレート、アクロレインーエチレングリコールジメタクリレート共重合体など、架橋化アルブミン、コラーゲン、ゼラチン、デキストラン、アガロース、架橋アガロース、セルロース、微結晶セルロース、カルボキシメチルセルロース、セルロースアセ

テートなどの天然または変成セルロース、架橋デキストラン、ナイロンなどのポリアミド、ポリウレタン、ポリエポキシ樹脂などの有機高分子物質、さらにそれらを乳化重合して得られたもの、細胞、赤血球などで、必要に応じ、シランカップリング剤などで官能性基を導入してあるものが挙げられる。

さらに、ろ紙、ビーズ、試験容器の内壁、例えば試験管、タイタープレート、タイターウェル、ガラスセル、合成樹脂製セルなどの合成材料からなるセル、ガラス棒、合成材料からなる棒、末端を太くしたりあるいは細くしたりした棒、末端に丸い突起をつけたりあるいは偏平な突起をつけた棒、薄板状にした棒などの固体物質（物体）の表面などが挙げられる。

#### 【0068】

これら担体へは、抗体を結合させることができ、好ましくは本発明で得られる抗原に対し特異的に反応するモノクローナル抗体を結合させることができる。担体とこれら抗原抗体反応に関与するものとの結合は、吸着などの物理的な手法、あるいは縮合剤などを用いたり、活性化されたものなどを用いたりする化学的な方法、さらには相互の化学的な結合反応を利用した手法などにより行うことができる。

標識としては、酵素、酵素基質、酵素インヒビター、補欠分子類、補酵素、酵素前駆体、アポ酵素、蛍光物質、色素物質、化学ルミネッセンス化合物、発光物質、発色物質、磁気物質、金属粒子、例えば金コロイドなど、放射性物質などを挙げることができる。酵素としては、脱水素酵素、還元酵素、酸化酵素などの酸化還元酵素、例えばアミノ基、カルボキシル基、メチル基、アシル基、リン酸基などを転移するのを触媒する転移酵素、例えばエステル結合、グリコシド結合、エーテル結合、ペプチド結合などを加水分解する加水分解酵素、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼなどを挙げることができる。酵素は複数の酵素を複合的に用いて検知に利用することもできる。例えば酵素的サイクリングを利用することもできる。

#### 【0069】

代表的な放射性物質の標識用同位体元素としては、 $[^{32}\text{P}]$ ,  $[^{125}\text{I}]$ ,  $[^{131}\text{I}]$ ,  $[^3\text{H}]$ ,  $[^{14}\text{C}]$ ,  $[^{35}\text{S}]$  などが挙げられる。



代表的な酵素標識としては、西洋ワサビペルオキシダーゼなどのペルオキシダーゼ、大腸菌  $\beta$ -D-ガラクトシダーゼなどのガラクトシダーゼ、マレー・デヒドロゲナーゼ、グルコース-6-フォスフェート・デヒドロゲナーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、カタラーゼ、ウシ小腸アルカリホスファターゼ、大腸菌アルカリホスファターゼなどのアルカリホスファターゼなどが挙げられる。

アルカリホスファターゼを用いた場合、4-メチルウンベリフェリルフォスフェートなどのウンベリフェロン誘導体、ニトロフェニルホスフェートなどのリン酸化フェノール誘導体、NADPを利用した酵素的サイクリング系、ルシフェリン誘導体、ジオキセタン誘導体などの基質を使用したりして、生ずる蛍光、発光などにより測定できる。ルシフェリン、ルシフェラーゼ系を利用したりすることもできる。カタラーゼを用いた場合、過酸化水素と反応して酸素を生成するので、その酸素を電極などで検知することもできる。電極としてはガラス電極、難溶性塩膜を用いるイオン電極、液膜型電極、高分子膜電極などであることもできる。

酵素標識は、ビオチン標識体と酵素標識アビジン（ストレプトアビジン）に置き換えることも可能である。標識は、複数の異なった種類の標識を使用することもできる。こうした場合、複数の測定を連続的に、あるいは非連続的に、そして同時にあるいは別々に行うことを可能にすることもできる。

#### 【0070】

本発明においては、信号の形成に4-ヒドロキシフェニル酢酸、1,2-フェニレンジアミン、テトラメチルベンジジンなどと西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ、ウンベリフェリルガラクトシド、ニトロフェニルガラクトシドなどと  $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、グルコース-6-リン酸・デヒドロゲナーゼなどの酵素試薬の組合わせも利用でき、ヒドロキノン、ヒドロキシベンゾキノン、ヒドロキシアントラキノンなどのキノール化合物、リボ酸、グルタチオンなどのチオール化合物、フェノール誘導体、フェロセン誘導体などを酵素などの働きで形成しうるものが使用できる。

蛍光物質あるいは化学ルミネッセンス化合物としては、フルオレセインイソチオシアネート、例えばローダミンBイソチオシアネート、テトラメチルローダミ

ンイソチオシアネートなどのローダミン誘導体、ダンシルクロリド、ダンシルフルオリド、フルオレスカミン、フィコビリプロテイン、アクリジニウム塩、ルミフェリン、ルシフェラーゼ、エクォリンなどのルミノール、イミダゾール、シュウ酸エステル、希土類キレート化合物、クマリン誘導体などが挙げられる。

標識するには、チオール基とマレイミド基の反応、ピリジルジスルフィド基とチオール基の反応、アミノ基とアルデヒド基の反応などを利用して行うことができ、公知の方法あるいは当該分野の当業者が容易になしうる方法、さらにはそれらを修飾した方法の中から適宜選択して適用できる。また上記免疫原性複合体作製に使用されることのできる縮合剤、担体との結合に使用されることのできる縮合剤などを用いることができる。

#### 【0071】

縮合剤としては、例えばホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、ヘキサメチレンジイソシアネート、ヘキサメチレンジイソチオシアネート、N,N'-ポリメチレンビスヨードアセトアミド、N,N'-エチレンビスマレイミド、エチレングリコールビススクシニミジルスクシネート、ビスジアゾベンジジン、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、スクシンイミジル 3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート (SPDP)、N-スクシンイミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート (SMCC)、N-スルホスクシンイミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、N-スクシンイミジル (4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート、N-スクシンイミジル 4-(1-マレイミドフェニル)ブチレート、N-(ε-マレイミドカプロイルオキシ)コハク酸イミド (EMCS)、イミノチオラン、S-アセチルメルカプトコハク酸無水物、メチル-3-(4'-ジチオピリジル)プロピオンイミデート、メチル-4-メルカプトブチリルイミデート、メチル-3-メルカプトプロピオンイミデート、N-スクシンイミジル-S-アセチルメルカプトアセテートなどが挙げられる。

#### 【0072】

本発明の測定法によれば、測定すべき物質を酵素などで標識したモノクローナル抗体などの標識抗体試薬と、担体に結合された抗体とを順次反応させることができるし、同時に反応させることもできる。試薬を加える順序は選ばれた担体系

の型により異なる。感作されたプラスチックなどのビーズを用いた場合には、酵素などで標識したモノクローナル抗体などの標識抗体試薬を測定すべき物質を含む検体試料と共に最初適当な試験管中に一緒に入れ、その後該感作されたプラスチックなどのビーズを加えることにより測定を行うことができる。

本発明の定量法においては、免疫学的測定法が用いられるが、その際の固相担体としては、抗体などタンパク質を良く吸着するポリスチレン製、ポリカーボネイト製、ポリプロピレン製あるいはポリビニル製のボール、マイクロプレート、スティック、微粒子あるいは試験管などの種々の材料および形態を任意に選択し、使用することができる。

測定にあたっては至適pH、例えばpH約4～約9に保つように適当な緩衝液系中で行うことができる。特に適切な緩衝剤としては、例えばアセテート緩衝剤、クエン酸塩緩衝剤、フォスフェート緩衝剤、トリス緩衝剤、トリエタノールアミン緩衝剤、ボレート緩衝剤、グリシン緩衝剤、炭酸塩緩衝剤、Tris-HCl緩衝剤などが挙げられる。緩衝剤は互いに任意の割合で混合して用いることができる。抗原抗体反応は約0～約60℃の間の温度で行うことが好ましい。

酵素などで標識されたモノクローナル抗体などの抗体試薬及び担体に結合せしめられた抗体試薬、さらには測定すべき物質のインキュベーション処理は、平衡に達するまで行うことができるが、抗原抗体反応の平衡が達成されるよりもずっと早い時点で固相と液相とを分離して限定されたインキュベーション処理の後に反応を止めることができ、液相又は固相のいずれかにおける酵素などの標識の存在の程度を測ることができる。測定操作は、自動化された測定装置を用いて行うことが可能であり、ルミネセンス・ディテクター、ホト・ディテクターなどを使用して基質が酵素の作用で変換されて生ずる表示シグナルを検知して測定することもできる。

### 【0073】

抗原抗体反応においては、それぞれ用いられる試薬、測定すべき物質、さらには酵素などの標識を安定化したり、抗原抗体反応自体を安定化するように適切な手段を講ずることができる。さらに、非特異的な反応を除去し、阻害的に働く影響を減らしたり、あるいは測定反応を活性化したりするため、タンパク質、安定

化剤、界面活性化剤、キレート化剤などをインキュベーション溶液中に加えることもできる。キレート化剤としては、エチレンジアミン四酢酸塩 (EDTA) がより好ましい。

当該分野で普通に採用されていたりあるいは当業者に知られた非特異的結合反応を防ぐためのブロッキング処理を施してもよく、例えば、哺乳動物などの正常血清タンパク質、アルブミン、スキムミルク、乳発酵物質、コラーゲン、ゼラチンなどで処理することができる。非特異的結合反応を防ぐ目的である限り、それらの方法は特に限定されず用いることが出来る。

本発明の測定方法で測定される試料としては、あらゆる形態の溶液やコロイド溶液、非流体試料などが使用しうるが、好ましくは生物由来の試料、例えば胸腺、睾丸、腸、腎臓、脳、乳癌、卵巣癌、結腸・直腸癌、血液、血清、血漿、関節液、脳脊髄液、唾液、胆汁液、唾液、羊水、尿、その他の体液、細胞培養液、組織培養液、組織ホモジュネート、生検試料、組織、細胞などが挙げられる。

これら個々の免疫学的測定法を含めた各種の分析・定量法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて、本発明の当該対象物質あるいはそれと実質的に同等な活性を有する物質に関連した測定系を構築すればよい。

#### 【0074】

これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編、「ラジオイムノアッセイ」、講談社、昭和49年発行；入江 寛編、「続ラジオイムノアッセイ」、講談社、昭和54年発行；石川栄治ら編、「酵素免疫測定法」、医学書院、昭和53年発行；石川栄治ら編、「酵素免疫測定法」(第2版)、医学書院、昭和57年発行；石川栄治ら編、「酵素免疫測定法」(第3版)、医学書院、昭和62年発行；H. V. Vunakis et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 70 (Immunochemical Techniques, Part A), Academic Press, New York (1980); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 73 (Immunochemical Techniques, Part B), Academic Press, New York (1981); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology",

Vol. 74 (Immunochemical Techniques, Part C), Academic Press, New York (1981); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 84 (Immunochemical Techniques, Part D: Selected Immunoassays), Academic Press, New York (1982); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 92 (Immunochemical Techniques, Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods), Academic Press, New York (1983); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 121 (Immunochemical Techniques, Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies), Academic Press, New York (1986); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 178 (Antibodies, Antigens, and Molecular Mimicry), Academic Press, New York (1989); M. Wilchek et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 184 (Avidin-Biotin Technology), Academic Press, New York (1990); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 203 (Molecular Design and Modeling: Concepts and Applications, Part B: Antibodies and Antigens, Nucleic Acids, Polysaccharides, and Drugs), Academic Press, New York (1991) などあるいはそこで引用された文献（それらの中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含められる）】。

#### 【0075】

本発明の抗p30 抗体（抗ヒトp30 抗体、抗マウスp30 抗体など）、特にモノクローナル抗体を用いて、エピトープマッピングを行うこともでき、各エピトープを認識する抗体を用いれば当該タンパク質及びその関連ペプチド断片などの検知・測定を行うことができる。

当該タンパク質及びその関連ペプチド断片に対する抗体は、当該タンパク質による細胞接着、活性化型Rap1との結合、それに起因する様々な生理現象、生物活性の制御あるいは促進または抑制などの現象の検出及び／又は測定、さらには当該p30 タンパク質などの過剰あるいは減少により生ずる各種の生理活性物質あるいは生理現象又は生物現象の検出及び／又は測定、また、当該p30-Rap1相互作用を制御する因子や機構の研究・開発などに有用である。該抗体、特にモノクローナル抗体は、(i) 当該p30-Rap1の相互作用に起因する組織あるいは細胞が関連す

る障害、異常及び／又は疾患を検出したり、(ii) 当該p30-Rap1の相互作用に起因する細胞の腫瘍化、細胞の移動、浸潤、遊走及び／又は転移あるいはその可能性を検出したり、(iii) 当該p30-Rap1の相互作用の関与する細胞接着あるいは細胞の遊走に関連して生ずる障害、異常及び／又は疾患あるいはその可能性を検出したり、(iv) 当該p30 タンパク質の発現量を測定したり、(v) 活性化されたRap1とp30 との結合の変化を検出及び／又は測定したり、(vi) 当該p30-Rap1結合などを制御する化合物などの探索をしたり、及び／又は(vii) 該当該p30 タンパク質産生を制御する化合物の活性の検知及び／又は測定をしたりなどするのに有用である。免疫応答、炎症、血管新生、血液凝固、創傷治癒、再生プロセス、癌化、癌細胞の浸潤、転移、自己免疫におけるプロセス、血液学的なプロセス、細胞の異常、組織の異常、がんの移動性、浸潤性、走化性及び／又は転移性の程度を知るのに使用できると期待される。

本発明に従えば、当該p30-Rap1間の結合による様々な生理活性あるいは生物活性による現象・作用の促進活性あるいは抑制・阻害活性を検出及び／又は測定し、組織の疾患予防・治療剤、抗炎症剤、抗がん剤、がん転移阻害剤、動脈硬化症治療剤、関節破壊治療剤、抗アレルギー剤及び／又は免疫抑制剤の効果判定モニターとして使用することが可能となる。

また、本発明では、当該タンパク質による組織・細胞あるいはタンパク質の異常化現象の検出及び／又は測定方法やそのための試薬が提供できる。

#### 【0076】

本発明の活性成分〔例えば、(a) 当該p30 関連ポリペプチド、その一部のペプチドまたはそれらの塩、変異p30 ペプチドやそれに関連するペプチド等、(b) 該当該p30 やRap1タンパク質あるいは当該ポリペプチドをコードするDNA などの核酸等、(c) 本発明の抗体、その一部断片（モノクローナル抗体を包含する）またはその誘導体、(d) 当該p30 とRap1との間の相互作用、例えば結合など、を制御する化合物（当該結合を促進したりあるいは抑制・阻害するなどの現象、あるいは組織あるいはタンパク質の変質・過剰生産あるいは分解現象といった生物学的活性を促進あるいは抑制及び／又は阻害する化合物）またはその塩、当該p30 タンパク質産生を制御する化合物またはその塩、(e) 本発明で課題とするDNA など

の核酸に対するアンチセンス・オリゴヌクレオチドなど、(f) 本発明を使用して見出された活性物質など] を医薬として用いる場合、例えば当該p30 とRap1との間の結合阻害剤またはそれらの塩等は、通常単独或いは薬理的に許容される各種製剤補助剤と混合して、医薬組成物又は医薬調製物などとして投与することができる。好ましくは、経口投与、局所投与、または非経口投与等の使用に適した製剤調製物の形態で投与され、目的に応じていずれの投与形態（吸入法、あるいは直腸投与も包含される）によってもよい。

また、本発明の活性成分は、各種医薬、例えば抗腫瘍剤（抗がん剤）、腫瘍移行阻害剤、血栓形成阻害剤、関節破壊治療剤、鎮痛剤、消炎剤及び／又は免疫抑制剤と配合して使用することもでき、それらは、有利な働きを持つものであれば制限なく使用でき、例えば当該分野で知られたものの中から選択することができる。

#### 【0077】

そして、非経口的な投与形態としては、局所、経皮、静脈内、筋肉内、皮下、皮内もしくは腹腔内投与を包含し得るが、患部への直接投与も可能であり、またある場合には好適でもある。好ましくはヒトを含む哺乳動物に経口的に、あるいは非経口的（例、細胞内、組織内、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、腹腔内、胸腔内、脊髓腔内、点滴法、注腸、経直腸、点耳、点眼や点鼻、歯、皮膚や粘膜への塗布など）に投与することができる。具体的な製剤調製物の形態としては、溶液製剤、分散製剤、半固形製剤、粉粒体制剤、成型製剤、浸出製剤などが挙げられ、例えば、錠剤、被覆錠剤、糖衣を施した剤、丸剤、トローチ剤、硬カプセル剤、軟カプセル剤、マイクロカプセル剤、埋込剤、粉末剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、注射剤、液剤、エリキシル剤、エマルジョン剤、灌注剤、シロップ剤、水剤、乳剤、懸濁剤、リニメント剤、ローション剤、エアゾール剤、スプレー剤、吸入剤、噴霧剤、軟膏製剤、硬膏製剤、貼付剤、パスタ剤、パップ剤、クリーム剤、油剤、坐剤（例えば、直腸坐剤）、チンキ剤、皮膚用水剤、点眼剤、点鼻剤、点耳剤、塗布剤、輸液剤、注射用液剤などのための粉末剤、凍結乾燥製剤、ゲル調製品等が挙げられる。

医薬用の組成物は通常の方法に従って製剤化することができる。例えば、適宜

必要に応じて、生理学的に認められる担体、医薬として許容される担体、アジュバント剤、賦形剤、補形剤、希釈剤、香味剤、香料、甘味剤、ベヒクル、防腐剤、安定化剤、結合剤、pH調節剤、緩衝剤、界面活性剤、基剤、溶剤、充填剤、増量剤、溶解補助剤、可溶化剤、等張化剤、乳化剤、懸濁化剤、分散剤、増粘剤、ゲル化剤、硬化剤、吸収剤、粘着剤、弾性剤、可塑剤、崩壊剤、噴射剤、保存剤、抗酸化剤、遮光剤、保湿剤、緩和剤、帯電防止剤、無痛化剤などを単独もしくはは組合わせて用い、それとともに本発明のタンパク質等を混和することによって、一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態にして製造することができる。

非経口的使用に適した製剤としては、活性成分と、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る媒体との無菌性溶液、または懸濁液剤など、例えば注射剤等が挙げられる。一般的には、水、食塩水、デキストロース水溶液、その他関連した糖の溶液、エタノール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなどのグリコール類が好ましい注射剤用液体担体として挙げられる。注射剤を調製する際は、蒸留水、リンゲル液、生理食塩液のような担体、適当な分散化剤または湿化剤及び懸濁化剤などを使用して当該分野で知られた方法で、溶液、懸濁液、エマルジョンのごとき注射しうる形に調製する。

#### 【0078】

注射用の水性液としては、例えば生理食塩液、ブドウ糖やその他の補助薬（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）を含む等張液などが挙げられ、薬理的に許容される適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノールなど）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート 80<sup>TM</sup>、HCO-50など）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などが挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）又は浸透圧調節のための試薬、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）



、アスコルビン酸などの酸化防止剤、吸収促進剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

#### 【0079】

非経口投与には、界面活性剤及びその他の薬学的に許容される助剤を加えるか、あるいは加えずに、水、エタノール又は油のような無菌の薬学的に許容される液体中の溶液あるいは懸濁液の形態に製剤化される。製剤に使用される油性ベヒクルあるいは溶剤としては、天然あるいは合成あるいは半合成のモノあるいはジあるいはトリグリセリド類、天然、半合成あるいは合成の油脂類あるいは脂肪酸類が挙げられ、例えばピーナッツ油、トウモロコシ油、大豆油、ゴマ油などの植物油が挙げられる。例えば、この注射剤は、通常本発明化合物を0.1～10重量%程度含有するように調製されることができる。

局所的、例えば口腔、又は直腸的使用に適した製剤としては、例えば洗口剤、歯磨き剤、口腔噴霧剤、吸入剤、軟膏剤、歯科充填剤、歯科コーティング剤、歯科ペースト剤、坐剤等が挙げられる。洗口剤、その他歯科用剤としては、薬理的に許容される担体を用いて慣用の方法により調製される。口腔噴霧剤、吸入剤としては、本発明化合物自体又は薬理的に許容される不活性担体とともにエアゾール又はネブライザー用の溶液に溶解させるかあるいは、吸入用微粉末として歯などへ投与できる。軟膏剤は、通常使用される基剤、例えば、軟膏基剤（白色ワセリン、パラフィン、オリーブ油、マクロゴール400、マクロゴール軟膏など）等を添加し、慣用の方法により調製される。

#### 【0080】

歯、皮膚への局所塗布用の薬品は、適切に殺菌した水または非水賦形剤の溶液または懸濁液に調剤することができる。添加剤としては、例えば亜硫酸水素ナトリウムまたはエデト酸二ナトリウムのような緩衝剤；酢酸または硝酸フェニル水銀、塩化ベンザルコニウムまたはクロロヘキシジンのような殺菌および抗真菌剤を含む防腐剤およびヒプロメルローズのような濃厚剤が挙げられる。

坐剤は、当該分野において周知の担体、好ましくは非刺激性の適当な補形剤、例えばポリエチレングリコール類、ラノリン、カカオ脂、脂肪酸トリグリセライド等の、好ましくは常温では固体であるが腸管の温度では液体で直腸内で融解し

薬物を放出するものなどを使用して、慣用の方法により調製されるが、通常本発明化合物を0.1～95重量%程度含有するように調製される。使用する賦形剤および濃度によって薬品は、賦形剤に懸濁させるかまたは溶解させることができる。局所麻酔剤、防腐剤および緩衝剤のような補助薬は、賦形剤に溶解可能である。

経口的使用に適した製剤としては、例えば錠剤、丸剤、カプセル剤、粉末剤、顆粒剤、トローチのような固形組成物や、液剤、シロップ剤、懸濁剤のような液状組成物等が挙げられる。製剤調製する際は、当該分野で知られた製剤補助剤などを用いる。錠剤及び丸剤はさらにエンテリックコーティングされて製造されることもできる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含むことができる。

#### 【0081】

また、活性成分がタンパク質やポリペプチドである場合、ポリエチレングリコール (PEG) は、哺乳動物中で極めて毒性が低いことから、それを結合させることは特に有用である。また、PEG を結合せしめると、異種性化合物の免疫原性及び抗原性を効果的に減少せしめることができる場合がある。該化合物は、マイクロカプセル装置の中に入れて与えてもよい。PEG のようなポリマーは、アミノ末端のアミノ酸の  $\alpha$ -アミノ基、リジン側鎖の  $\epsilon$ -アミノ基、アスパラギン酸又はグルタミン酸側鎖のカルボキシル基、カルボキシ末端のアミノ酸の  $\alpha$ -カルボキシル基、又はある種のアスパラギン、セリン又はトレオニン残基に付着したグリコシル鎖の活性化された誘導体に、簡便に付着させることができる。

タンパク質との直接的な反応に適した多くの活性化された形態のPEG が知られている。タンパク質のアミノ基と反応させるのに有用なPEG 試薬としては、カルボン酸、カルボネート誘導体の活性エステル、特に、脱離基がN-ヒドロキシスクシンイミド、p-ニトロフェノール、イミダゾール、又は1-ヒドロキシ-2-ニトロベンゼン-4-スルフォネートであるものが挙げられる。同様に、アミノヒドラジン又はヒドラジド基を含むPEG 試薬は、タンパク質中の過ヨウ素酸酸化によって生成したアルデヒドとの反応に有用である。

#### 【0082】

さらに、本発明のDNA などの核酸を上記したような治療及び／又は予防剤とし

て用いる場合、該核酸はそれを単独で用いることもできるし、あるいは上記したような遺伝子組換え技術で使用する適当なベクター、例えばレトロウイルス由来ベクターなどウイルス由来のベクターなどに結合させるなどして用いることができる。本発明のDNAなどの核酸は通常の方法で投与でき、そのまま、あるいは、例えば細胞内への摂取が促進されるように、適当な補助剤あるいは生理的に許容される担体などと共に、製剤化されて用いることができ、上記したような、医薬組成物又は医薬調製物などとして投与することができる。また遺伝子治療として知られた方法を適用することもできる。

本発明の活性成分は、その投与量を広範囲にわたって選択して投与できるが、その投与量及び投与回数などは、処置患者の性別、年齢、体重、一般的健康状態、食事、投与時間、投与方法、排泄速度、薬物の組み合わせ、患者のその時に治療を行なっている病状の程度に応じ、それらあるいはその他の要因を考慮して決められる。

#### 【0083】

医薬品製造にあたっては、その添加剤等や調製法などは、例えば日本薬局方解説書編集委員会編、第十四改正 日本薬局方解説書、平成13年6月27日発行、株式会社廣川書店；一番ヶ瀬 尚 他編 医薬品の開発12巻（製剤素剤〔I〕）、平成2年10月15日発行、株式会社廣川書店；同、医薬品の開発12巻（製剤素材〔II〕）平成2年10月28日発行、株式会社廣川書店などの記載を参考にしてそれらのうちから必要に応じて適宜選択して適用することができる。

本発明の活性成分は、当該p30 とRap1との間の相互作用活性（例えば、結合活性などの生物活性など）を制御（促進あるいは抑制・阻害）するといった生物学的活性をもつものであれば特に限定されないが、好ましくは有利な作用を持つものが挙げられる。本発明の活性成分は、例えば、(a) 当該改変p30 タンパク質、その変異体ポリペプチド、その一部のペプチドまたはそれらの塩等、(b) 該タンパク質をコードするDNA、当該タンパク質変異体ポリペプチドをコードするDNAなどの核酸等、(c) 本発明の抗体、その一部断片（モノクローナル抗体を包含する）またはその誘導体、(d) 当該p30 とRap1との間の相互作用に起因する生体成分との間の相互作用を制御（促進あるいは抑制・阻害）するといった生物学

的活性に有利な作用をもつ化合物またはその塩などが包含される。

#### 【0084】

本発明の活性成分は、当該p30 とRap1との間の相互作用に起因する各種組織あるいは細胞における変化を制御（促進あるいは抑制・阻害）するのに有用と期待される。また、該活性成分は、当該p30 あるいは活性化型Rap1の活性発現の制御、さらにはp30-Rap1結合の制御（促進あるいは抑制・阻害）に有用であり、当該相互作用に起因する障害、異常及び／又は疾患の予防あるいは治療に有用である。また、当該p30-Rap1結合が関与する腫瘍細胞などの、例えば移動、浸潤、遊走及び／又は転移の制御、例えば抑制に有用であると期待される。

本発明の活性成分は、例えばp30-Rap1結合阻害剤は、炎症疾患、自己免疫疾患、臓器移植時の拒絶反応の抑制、癌などを処置するための薬剤として有用であり、例えば胃潰瘍、十二指腸潰瘍、急性膵炎、気管支炎、ARDS（急性呼吸窮迫症候群）、COPD（慢性閉塞性肺疾患）、敗血症性ショック、MOF（多臓器不全）、SIRS（全身性炎症反応症候群）、全身性エリテマトーデス、混合型結合組織病、慢性関節リウマチ、シェーグレン症候群、リウマチ熱、グッドパスチャー症候群、バセドウ病、橋本病、アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、特発性血小板減少性紫斑病、重症筋無力症、潰瘍性大腸炎、クローン病、交換性眼炎、多発性硬化症、乾癬、アレルギー性鼻炎、喘息などを処置するため、臓器移植時の拒絶反応の抑制のため移植前処理、移植後投与のため、さらには発癌抑制、転移抑制などのために使用できると期待される。

#### 【0085】

##### 【実施例】

以下に実施例を掲げ、本発明を具体的に説明するが、この実施例は単に本発明の説明のため、その具体的な態様の参考のために提供されているものである。これらの例示は本発明の特定の具体的な態様を説明するためのものであるが、本願で開示する発明の範囲を限定したり、あるいは制限することを表すものではない。本発明では、本明細書の思想に基づく様々な実施形態が可能であることは理解されるべきである。

なお、DNA の切断、連結、大腸菌の形質転換、遺伝子の塩基配列決定、ハイブ

リダイゼーション等一般の遺伝子組換えに必要な方法は、各操作に使用する市販の試薬、機械装置等に添付されている説明書や、実験書（例えば「Molecular cloning (Maniatis T. et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press)」）に基本的に従った。全ての実施例は、他に詳細に記載するもの以外は、標準的な技術を用いて実施したもの、又は実施することのできるものであり、これは当業者にとり周知で慣用的なものである。

## 【0086】

### 実施例 1

#### (Rap1会合分子p30の単離)

Rap1に会合する分子を同定するため、Rap1の活性化型変異体Rap1V12をbaitに酵母Two-hybrid法によってヒト白血球cDNAライブラリをスクリーニングした。その結果、Ras/Rap結合ドメイン(RBD)をもつ分子量3万の蛋白質をコードする分子を単離し、p30と命名した(図1)。データベースの検索によりp30はNore1とRBDドメインを含んでC末端側までアミノ酸が一致していた(図1)。ヒトゲノムデータベースの解析から、p30はNore1のalternative splicing productであることがわかった。RT-PCR法によりマウスp30cDNAも単離した。

p30がRap1に結合するかどうか検討した。そのためRap1のN-末端側を GSH (glutathione-S-transferase) と融合させた蛋白質 (GST-Rap1) を大腸菌で産生させ、グルタチオン結合カラムを用いて精製した。またp30cDNAのN-末端側にMycエピトープを付加したMyc-p30遺伝子をCOS細胞にトランスフェクションしてp30を大量に発現している可溶化物を作成した。Rap1はGTPと結合すると活性化型になり、GDPと結合すると不活化型になるので、GST-Rap1をGTPγS、GDPβSとそれぞれ結合させ、活性化型と不活化型を用意し、Myc-p30を含むCOS細胞可溶化物と混合した。その後4℃で2時間転倒混和後、グルタチオン結合ビーズを加えてGST-Rap1を回収した。Rap1に結合したmyc-p30の検出は、一次抗体に抗MycマウスIgG2a 抗体(Cell Signaling)を用い、二次抗体にHRP 標識の抗マウスIgG (Sigma)を用いて、ECL 化学発光法で化学発光用フィルム(Amersham)を感光させて検出した(図2)。その結果、p30は活性化型Rap1特異的に結合することが明らかになった。活性化型Rap1に結合する性質から、p30はRap1の活性化に伴って機能する分子である

ことが考えられた。

### 【0087】

#### 実施例 2

(RT-PCR法によるp30 の組織発現分布)

p30の各組織での発現をみるため、RT-PCR法によってp30mRNAの発現を調べた。また類似分子Nore1の発現も比較検討した。脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓からRNAを抽出し、cDNAを合成後、PCR法によってp30 (P)とNore1 (N) cDNAを検出した(図3A)。mRNA量のコントロールとしてグルコース 3 リン酸脱水素酵素(G3PDH)を用いた。その結果、p30は脾臓と肺で強く発現がみられた。それに対してNore1は脳で主に発現していた。さらに種々の血液、免疫細胞株等での発現を同様の手法で調べたところ、p30は骨髄系(HL60, U937)、Tリンパ球(Jurkat, Molt4)、Bリンパ球系(BaF3, A20, Nalm6)の細胞株に発現し、メラノーマ細胞(B16)では発現していなかった。それに対して、Nore1はこれらの細胞で発現はみられず、メラノーマ細胞(B16)で発現が確認された。また未分化骨髄系細胞HL60はレチノイン酸処理によって好中球に分化するが、RT-PCR法により、p30mRNAの発現が増強した(HL60RA)ことが確認された。

### 【0088】

#### 実施例 3

(p30に対するモノクローナル抗体の作成)

p30蛋白質の発現を調べるためモノクローナル抗体の作成を行った。

マウスp30cDNAをpGEXベクター (Amersham Pharmacia) にsubcloningし、大腸菌(BL21)導入後、mp30のN末端側にGSTを融合させたGST-mp30を産生させた。導入したBL21をLB培地400ml、30℃で増殖させ、OD<sub>600</sub> 0.5に達した時点でIPTG (0.2mM, Amersham Pharmacia) を加え、さらに4時間培養した。BL21を6000回転で沈殿させ、PBSで一回洗浄後、PBS 5mlで懸濁後、超音波破碎装置(トミー精工、UD-200)で出力6、15秒間4回の条件で破碎する。9000回転で遠心後、上清をグルタチオンカラム(Amersham Pharmacia)に結合させ、100mlのPBSで洗浄後、グルタチオン(5mM)で溶出し、PBSに対して透析し精製抗原とした。

精製GST-humanp30と完全アジュバント(Difco)を混合し、ラット(WKY/NCrj、

雌 8 週齢、オリエンタルバイオサービス) の足底皮内に 0.2mg/0.1ml 注射した。1 週間後、不完全アジュバント (Difco) と混合した GST-mp30 (0.1mg/0.1ml) を再び足底に注射した。5 日後、腸骨リンパ節を採取し、ミエローマ細胞株 Sp2/0 とポリエチレングリコールを用いた細胞融合を行い、HAT 培地 (GibcoBRL) にてハイブリドーマの培養を行った (モノクローナル抗体作製マニュアル、多田伸彦著、学際企画、1995 年)。12 日後、培養上清を回収し、p30 に対する抗体を ELISA 法によって測定した。

### 【0089】

ELISA に用いる抗原として MBP (maltose-binding protein) と融合した MBP-hp30 を大腸菌で産生させ精製したものを使用した。MBP-hp30 は、human p30 cDNA を pMAL ベクター (New England Biolabs) に subcloning し、マルトース結合蛋白質との融合蛋白質を作製した (pML Protein Fusion and Purification System, New England Biolabs)。MBP-hp30 (0.2mg/0.2ml/well) を 96 穴プレートに固相化し、サンドイッチ法にて培養上清中の抗体を検出した (モノクローナル抗体作製マニュアル、多田伸彦著、学際企画、1995 年)。陽性であった上清について human p30 cDNA をトランスフェクトした COS 細胞を用いたウエスタンブロット法、及び免疫染色によって検定した。これらのアッセイで陽性であった 6 個のハイブリドーマについて限界希釈し、クローン化した。エピトープマッピングするため、p30 の N 末端欠失 (RBD ドメイン以降を含む)、C 末端欠失 (N 末端と RBD ドメインを含む)、RBD ドメイン欠失 (N 末端と C 末端のみ含む) 変異体を COS 細胞に発現させ、ウエスタン法にて検定したところ、N 末端を認識するもの 4 つ (B1.2, E3.7, E11.2, G7.3) と、C 末端を認識するもの 2 つ (B4.1, H10.5) であった。C 末端を認識する抗体は Norel にも反応したが、N 末端を認識する抗体 4 つすべて Norel に反応せず、p30 特異的抗体であることがわかった。血液、免疫系細胞株、及び、リンパ節から精製した T リンパ球、B リンパ球に対する、抗 p30 特異抗体 E11.2 を用いたウエスタンブロットの結果を示す (図 3B)。HL60 をレチノイン酸で処理して好中球に分化させた細胞 (HL60 RA)、vitamin D3 (1mM) と TPA (10 ng/ml) で刺激してマクロファージに分化させた細胞 (HL60 D3+T) では HL60 と比較して p30 の発現が増加していた。Nalm6 (B リンパ球系)、Molt4、Jurkat (T リンパ球系)、K562 (

赤芽球系)、TF-1 (骨髓系) で発現が認められた。(図 3 B)

#### 【0090】

##### 実施例 4

(細胞遊走に与えるp30の効果)

##### (1) 野生型のp30とRap1とを共に発現させた場合の細胞遊走

p30が活性化型Rap1 (Rap1V12) やケモカインによる細胞遊走にどのような影響をあたえるか調べるため、ヒトLFA-1を発現させたproB細胞株BAFにp30, Rap1V12, Rap1V12とp30の両方を発現させたBAF細胞を作成し、ICAM-1上での細胞遊走を測定した。用いたICAM-1としてヒトICAM-1細胞外領域をヒト免疫グロブリンFc領域と融合させた蛋白質(hICAM-1-Fc)を用いた。細胞遊走はBioptechs社のΔT Culture Dishシステム(ΔT Culture Dish system, Biotech, Inc)を用いた。径6cmの温度制御プレート上に ICAM-1(0.1mg/ml) を固相化し作成したBAF細胞を加え、20分間37℃でビデオ撮影した。それぞれの実験で移動距離を細胞20個について測定し、平均速度を計算した。その結果、Rap1V12はICAM-1上での細胞移動速度を増加させ、p30はさらにその効果を増強させた(図4)。

#### 【0091】

##### (2) p30のRBDドメインの変異体をRap1とを共に発現させた場合の細胞遊走

この系においてp30の増強効果がRap1と結合することによって起こるのかどうか調べるため、p30のRBDドメイン変異体(p30RBDm)を作成した。p30RBDmはRBDドメインで保存されている7つのアミノ酸、すなわち123番リジン、124番アルギニン、135番リジン、154番リジン、155番リジン、160番アスパラギン酸、161番アスパラギンをアラニンに置換した変異体である。このp30RBDmは野生型同様に発現するが、野生型と異なりGTP・Rap1に結合できない。Rap1V12とp30RBDmをBAF細胞に発現させ、ICAM-1上での移動速度を測定したところ、増強効果はみられなかった。従って、p30のRap1V12による細胞移動を促進する効果はRap1と結合することが必要であることがわかった。

次にケモカインによる細胞遊走への効果を検定した。ヒトLFA-1を発現させたBAF細胞にp30とp30RBDmを導入し、ICAM-1上での細胞移動をSDF-1(CXCL12) (20nM) 存在下に上記の方法で測定した。その結果、p30はSDF-1刺激による細胞遊走を約



2 倍に亢進した。一方、p30RBDmにはその効果がみられなかった。以上のことから、p30はRap1に結合してケモカインによる細胞遊走を亢進させる作用があることが明らかになった(図5)。

#### 【0092】

##### 実施例5

(p30によるLFA-1接着制御)

p30がRap1の下流エフェクター分子として、接着上昇作用に関与する可能性を探るため、p30を3A9T細胞へ過剰発現させ、3A9T細胞のLFA-1を介するICAM-1への接着活性への影響をadhesion assayにより検討した。すなわち、マウスICAM-1の細胞外領域をヒト免疫グロブリンFc領域に融合させ、2量体にしたキメラ蛋白質を作成し、プレート上に固相化し、細胞のICAM-1への接着活性を測定した。細胞はBCECF-AM (Molecular Probe)で蛍光色素でラベルし、ICAM-1 (0.1 mg/ml) を固相化したプレート上で、37℃で30分インキュベートした。Input細胞数、およびプレートを3回以上洗った後に残った細胞数(接着した細胞数)を蛍光リーダー(Cytofluor 4000, Perseptive Biosystems)で測定し、input細胞に対する接着した細胞の割合をその細胞の接着活性とした。その結果、3A9T細胞でのp30の発現量に応じて、LFA-1のICAM-1に対する接着活性が上昇することがわかった(図6A)。

#### 【0093】

またp30がRap1の下流で、接着に関与しているとすれば、p30への結合活性を失ったRap1のmutantでは、接着の上昇は認められないはずである。Rap1のeffector領域と呼ばれるアミノ酸配列が、p30を始めとする、Rap1の下流effector分子が結合する領域であることが、判明している。そこで活性型Rap1V12のこの領域にpoint mutationを導入した。Rap1の35番スレオニンをグルタミン酸(T35E)、37番グルタミン酸をグリシン(E37G)、38番アスパラギン酸をグルタミン酸(D38E)、40番チロシンをシステイン(Y40C)に置換した変異体を作製した。Rap1V12との会合からE37Gはp30への結合活性を残しているが、T35E, D38E, Y40Cはp30に結合できないことがわかった。そこでこれらの変異体を3A9T細胞へ導入した。その結果、p30に結合活性を残すE37Gでのみ、LFA-1のICAM-1への接着の上昇が認められ

た(図6B)。このことから、p30はRap1の下流で接着上昇に関与している可能性が示唆された。

#### 【0094】

TCR刺激によって誘導されるLFA-1/ICAM-1接着は、Rap1の活性化を介することが、Rap1の特異的阻害分子Spa-1を発現させると完全に抑制されることから、明かとなっている。従って、p30はRap1の下流で接着に関与するとしたら、TCRを介するLFA-1/ICAM-1接着を抑制すると予想される。そこで、p30の変異体を作成し、優勢抑制型に機能する変異体(deltaNp30)を作製した。deltaNp30はp30のN末端から100 アミノ酸欠失させて作製した。3A9T細胞へ導入し、TCR刺激によるLFA-1/ICAM-1接着を検討した。その結果、図6Cに示すように、deltaNp30は発現量依存性に、TCR刺激によるLFA-1のICAM-1への接着を抑制することが判明した。

以上の結果より、p30はRap1の下流で、LFA-1/ICAM-1を介した細胞接着に重要な役割を果たしていることが、明かとなった。

#### 【0095】

##### 実施例 6

(Ra1 とp30との結合に及ぼすN-(2-エチルスルホニルアミノ-5-トリフルオロメチル-3-ピリジル)シクロヘキサンカルボキサミド・一ナトリウム塩・一水和物(化合物1)の影響)

##### (1) GST-Rap1 ビーズの作成

GST-Rap1のフュージョンタンパクの産生用プラスミドを構築し、大腸菌に遺伝子導入した。プラスミドの組み込まれた大腸菌を培養し、0.2mM IPTG (イソプロピルチオガラクトピラノシド) にてタンパク産生誘導をかけて(30℃、2時間)大腸菌内にGST-Rap1タンパク質を産生させた。大腸菌を遠心分離にて回収しLysis buffer (100mM NaCl, 50mM Tris-HCl(pH7.5), 1% Triton X100, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 T IU/ml Aprotinin)で溶解し、ソニケーションにて大腸菌膜を破壊した。その溶液を遠心分離し得られた上清にGlutathione Sepharose 4Bビーズ(Amersham)を加え4℃で1時間反応させ、GST-Rap1ビーズを作成した。

#### 【0096】

##### (2) p30可溶化物の調製

70%コンフルエントの293T細胞にp30-Myc tagのプラスミドをエレクトロポレーション法で導入した。導入した細胞を2日間培養し、遠心分離にて回収した。回収した細胞をLysis bufferで溶解し、遠心分離の後に上清を回収しp30 Lysateとした。

### 【0097】

#### (3) 結合阻害試験

GST-Rap1ビーズ25 $\mu$ LをLoading buffer(25mM Tris-HCl(pH7.5), 2mM EDTA, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT)で洗浄し、2mM GTP $\gamma$ S(sigma)を加えて37℃ 15分インキュベートしRap1を活性化した。ここに250 $\mu$ Lのp30 Lysateを加えて4℃で30秒間反応させた。この30秒の反応直前に終濃度1 $\mu$ MとなるようにN-(2-エチルスルホニルアミノ-5-トリフルオロメチル-3-ピリジル)シクロヘキサンカルボキサミド・一ナトリウム塩・一水和物(化合物1)を加えた。反応後Lysis bufferで4回洗浄し、遠心で沈殿したビーズに25 $\mu$ Lの通常のサンプルバッファーを加えてSDS-PAGEのサンプルとした。このサンプルをSDS-PAGEにかけてウエスタンブロッティングを行った。P30の検出は一次抗体に抗MycマウスIgG2a抗体(Cell Signaling)を用い、二次抗体にHRP標識の抗マウスIgG(Sigma)を用いて、ECL化学発光法で化学発光用フィルム(Amersham)を感光させて検出した。

化学発光用フィルムを感光させて得られたバンドを画像解析ソフト(win Roof、三谷商事)を用いて定量化した。即ち、比較すべきp30のバンドを二値化処理により抽出し、輝度 $\times$ 面積のカテゴリーの体積を比較した。

化合物1の1 $\mu$ M処理区において、この値は、無添加区に比し著しく低い値となった(図7)。このことから化合物1はRap1とp30との結合を阻害すると考えられる。前記方法によれば、Rap1とp30との結合を阻害する有用な化合物のスクリーニングを行なうことが可能と考えられる。

同様に、例えば特開平6-263735号公報に開示の各種ジアミノトリフルオロメチルピリジン誘導体を使用してその活性をスクリーニングできる。

### 【0098】

#### 実施例7

##### (1) p30による微小管の発達

p30 の微小管細胞骨格への影響をみるために3A9T細胞にヒトp30 の遺伝子を導入した。3A9T細胞とp30 を導入した細胞(3A9/p30) を3.3%パラホルムアルデヒドで15分、室温で固定後、ポリLリジンをコートしたスライドにマウントした。PBS で洗浄後、2mM MgCl<sub>2</sub> を添加したPBS/0.2% Tx-100 を加え、5分間インキュベートした。PBS で洗浄後、5 %ヤギ血清で20分間ブロッキングした。その後、マウス抗チューブリン抗体(1%BSA で500倍希釈)を加え、1時間インキュベートした。4回PBS/0.1%BSA で洗浄後、400倍希釈Alexa488ラベルヤギ抗マウスIgG(Molecular Probe)を加え、1時間インキュベートした後、4回PBS/0.1%BSA で洗浄、共焦点レーザー顕微鏡で観察した(図8)。その結果、p30 を導入すると細胞の形態が変形し、微小管の発達が著しく亢進していることが明らかになった。このことからp30 は微小管を発達させる作用があることがわかった。

#### 【0099】

##### (2) T細胞と抗原提示細胞との接着におけるp30 とLFA-1 の局在

T細胞と抗原提示細胞(APC)との接着形成はT細胞の抗原認識を可能にする重要な接着であるが、この接着にはLFA-1/ICAM-1を介する。そこでこの接着におけるp30 とLFA-1 の局在を調べた。T細胞としてHEL(hen egg lysozyme)特異的3A9 T細胞、APCとしてCH27細胞を用いて検討した。CH27細胞(1x10<sup>5</sup>/ml)をHEL抗原(100 μg)を加えて16時間培養した。その後、同数の3A9 T細胞とCH27細胞(1x10<sup>5</sup>/ml)を混ぜ、37度で30分インキュベートした。3.3%パラホルムアルデヒドで15分、室温で固定後、ポリLリジンをコートしたスライドにマウントした。PBS で洗浄後、2mM MgCl<sub>2</sub> を添加したPBS/0.2% Tx-100 を加え、3分間インキュベートした。PBS で洗浄後、5 %ヤギ血清で20分間ブロッキングした。ラット抗p30 抗体(10 μg/ml)(E11.2)、を加え、1時間インキュベートした。4回PBS/0.1%で洗浄後、Alexa-546結合ラット抗マウスIgG(1%BSA で500倍希釈、Molecular Probe)を加え、1時間インキュベートした。ビオチン化マウス抗LFA-1 抗体(1%BSA で100倍希釈 Pharmingen)。4回PBS/0.1%で洗浄後、1%BSA で100倍希釈したFITC-ラベル抗ビオチン抗体(Jackson Laboratory)を加え、1時間インキュベートした。4回PBS/0.1%で洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した(図9:右下のp30 の写真は白黒表示では黒くて判別が

かないが、カラー表示では赤いシグナルが中心部に観察できる、またLFA-ではグリーンのシグナルが確認される)。その結果、LFA-1 とp30 はT-APC の接着面に集積し、両者は共局在した (merge)。これはp30 によるLFA-1 制御の機能とよく合致した局在と考えられる。

#### 【0100】

以下に本明細書で使用しているDNA塩基配列について説明及び開示する。

- (1) myc-tag (細胞の中でタンパク質として作られ、myc に対する抗体でも検出できるようにするための配列で開始コドンを含む)

ATGGAACAGAACTCATATCGGAGGAGGATCTA

#### 【0101】

- (2) 野生型のp30 の塩基配列 (上記myc-tag をつける場合は、開始コドンATG と入れ替える)

ATGACCGTGG ACAGCAGCAT GAGCAGTGGG TACTGCAGCC TGGACGAGGA ACTGGAAGAC  
TGCTTCTTCA CTGCTAAGAC TACCTTTTTC AGAAATGCGC AGAGCAAACA TCTTTCAAAG  
AATGTCTGTA AACCTGTGGA GGAAACACAG CGCCCGCCCA CACTGCAGGA GATCAAGCAG  
AAGATCGACA GCTACAACAC GCGAGAGAAG AACTGCCTGG GCATGAAACT GAGTGAAGAC  
GGCACCTACA CGGGTTTCAT CAAAGTGCAT CTGAAACTCC GGCGGCCTGT GACGGTGCCT  
GCTGGGATCC GGCCCCAGTC CATCTATGAT GCCATCAAGG AGGTGAACCT GGCGGCTACC  
ACGGACAAGC GGACATCCTT CTACCTGCCC CTAGATGCCA TCAAGCAGCT GCACATCAGC  
AGCACCACCA CCGTCAGTGA GGTCATCCAG GGGCTGCTCA AGAAGTTCAT GGTGTGGAC  
AATCCCCAGA AGTTTGCACT TTTTAAGCGG ATACACAAGG ACGGACAAGT GCTCTTCCAG  
AAACTCTCCA TTGCTGACCG CCCCTCTAC CTGCGCCTGC TTGCTGGGCC TGACACGGAG  
GTCCTCAGCT TTGTGCTAAA GGAGAATGAA ACTGGAGAGG TAGAGTGGGA TGCCTTCTCC  
ATCCCTGAAC TTCAGAACTT CCTAACAATC CTGGAAAAAG AGGAGCAGGA CAAAATCCAA  
CAAGTGCAAA AGAAGTATGA CAAGTTTAGG CAGAACTGG AGGAGGCCTT AAGAGAATCC  
CAGGGCAAAC CTGGGTAA

#### 【0102】

- (3) p30 の優勢抑制型 (N 末101 番目アラニンの前に開始コドン。ただし、図6 C で使用されているdeltaNp30 には前記myc-tag がついており、開始コドンと入

れ替っている)

ATGGCTGGGATCC GGCCCCAGTC CATCTATGAT GCCATCAAGG AGGTGAACCT GCGGGCTACC  
ACGGACAAGC GGACATCCTT CTACCTGCCC CTAGATGCCA TCAAGCAGCT GCACATCAGC  
AGCACCACCA CCGTCAGTGA GGTCATCCAG GGGCTGCTCA AGAAGTTCAT GGTGTGGAC  
AATCCCCAGA AGTTTGCACT TTTTAAGCGG ATACACAAGG ACGGACAAGT GCTCTTCCAG  
AAACTCTCCA TTGCTGACCG CCCCTCTAC CTGCGCCTGC TTGCTGGGCC TGACACGGAG  
GTCCTCAGCT TTGTGCTAAA GGAGAATGAA ACTGGAGAGG TAGAGTGGGA TGCCTTCTCC  
ATCCCTGAAC TTCAGAACTT CCTAACAATC CTGGAAAAAG AGGAGCAGGA CAAAATCCAA  
CAAGTGCAAA AGAAGTATGA CAAGTTTAGG CAGAACTGG AGGAGGCCTT AAGAGAATCC  
CAGGGCAAAC CTGGGTAA

### 【0103】

#### 【発明の効果】

本発明は、p30-Rap1間の相互作用により細胞の活性化及び情報伝達制御がなされているとの知見を利用する技術を提供している。本技術を利用すれば、p30-Rap1間の結合を阻害する化合物などのp30-Rap1間の相互作用制御物質をスクリーニングしたり、それに利用される試薬なども開発でき、さらに同定された阻害剤などのp30-Rap1結合制御剤は医薬として期待でき、抗炎症薬、免疫抑制剤、移植免疫抑制剤、抗癌剤などとして利用できる。さらに、改変p30 関連ペプチドや核酸、さらには抗p30 抗体などは、例えば細胞内で優勢抑制型に機能するもの、p30-Rap1間結合阻害の働きをもつものなどその有用性が高い。本技術・知識を利用して生体機能解析のための試薬、アッセイ法なども開発可能である。

本発明は、前述の説明及び実施例に特に記載した以外も、実行できることは明らかである。上述の教示に鑑みて、本発明の多くの改変及び変形が可能であり、従ってそれらも本件添付の請求の範囲の範囲内のものである。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 p30のアミノ酸配列及びその遺伝子構造を示す。同時にNore1のアミノ酸配列も示す。

【図2】 p30とRap1の会合についての解析結果を示す。ECL 化学発光法で化学発光用フィルムを感光させた写真である。

【図 3】 (A) RT-PCR法によるp30 の組織発現分布の結果を示す電気泳動写真である。(B) 各種細胞につき抗p30 特異抗体を用いたウエスタンブロットの結果を示す電気泳動写真である。

【図 4】 野生型のp30 あるいは p30のRBDドメインの変異体とRap1とを共に発現させた場合の細胞遊走に及ぼす影響を調べた結果を示す。右側は、ウエスタンブロットの結果を示す電気泳動写真である。

【図 5】 ケモカインによる細胞遊走に与えるp30の効果を示す。

【図 6】 (A) p30によるLFA-1接着制御効果を示す。(B) 変異体p30によるLFA-1接着制御効果を示す。p30に結合活性を残すE37Gでのみ、LFA-1のICAM-1への接着の上昇が認められた。(C) deltaNp30は発現量依存性に、TCR刺激によるLFA-1のICAM-1への接着を抑制する結果を示す。下の図は、deltaNp30の発現を示す電気泳動写真である。

【図 7】 化合物 1 のRap1とp30 との結合に及ぼす作用について試験した結果をしめす。

【図 8】 p30による微小管の発達の様子を共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果を示す顕微鏡写真である。

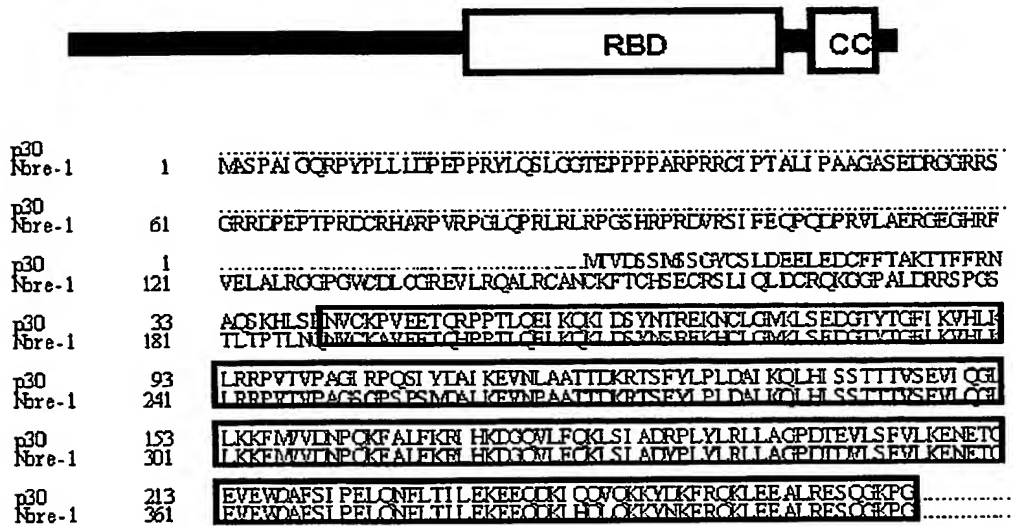
【図 9】 T細胞と抗原提示細胞との接着におけるp30 とLFA-1 の局在共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果を示す顕微鏡写真である。

【書類名】

図面

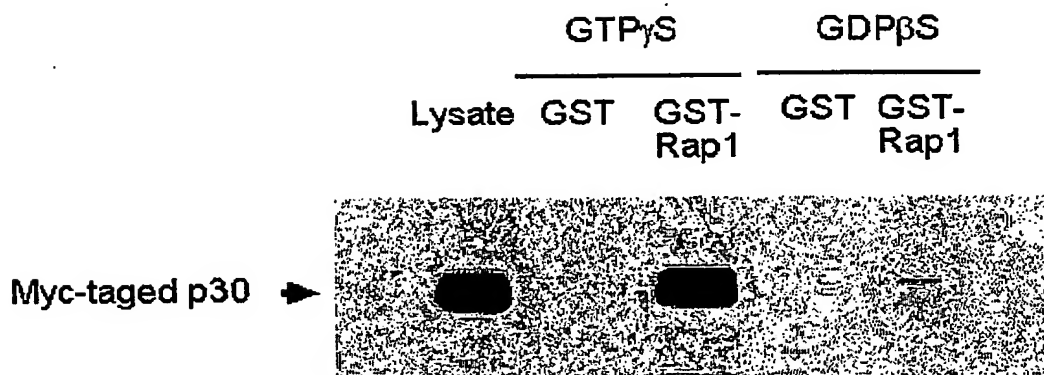
【図 1】

## Identification of Rap1-binding protein, p30



【図 2】

## Association of p30 with Rap1 in GTP-dependent manner





【図 3】

Expression of p30 in various mouse tissues and cell lines

図3A

RT-PCR

p30 (P)

Nore1(N)

G3PDH

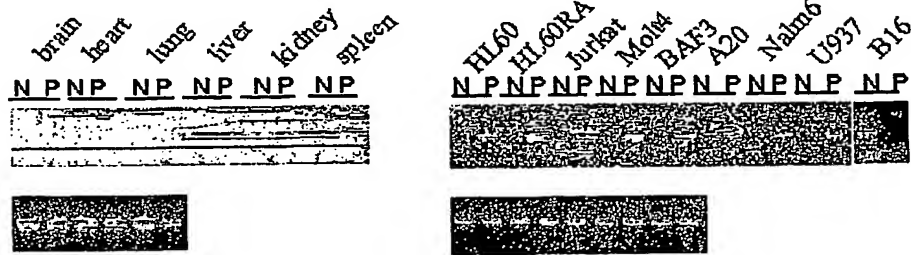
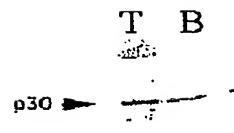
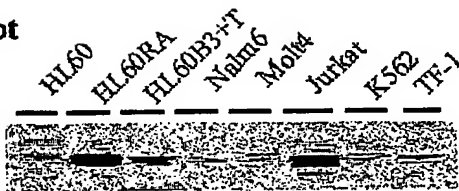


図3B

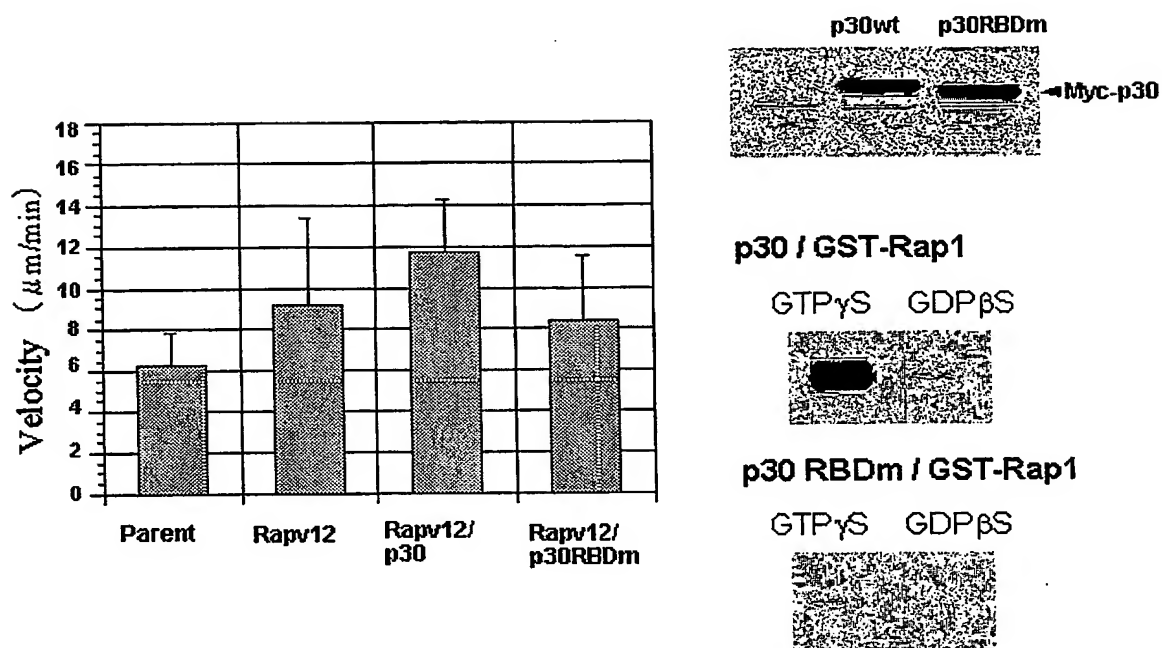
Western blot

30 kd

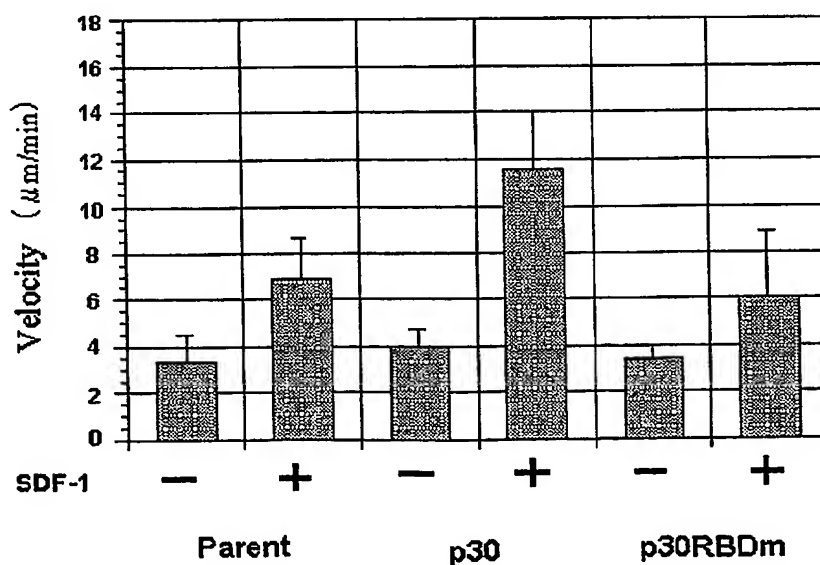


【図 4】

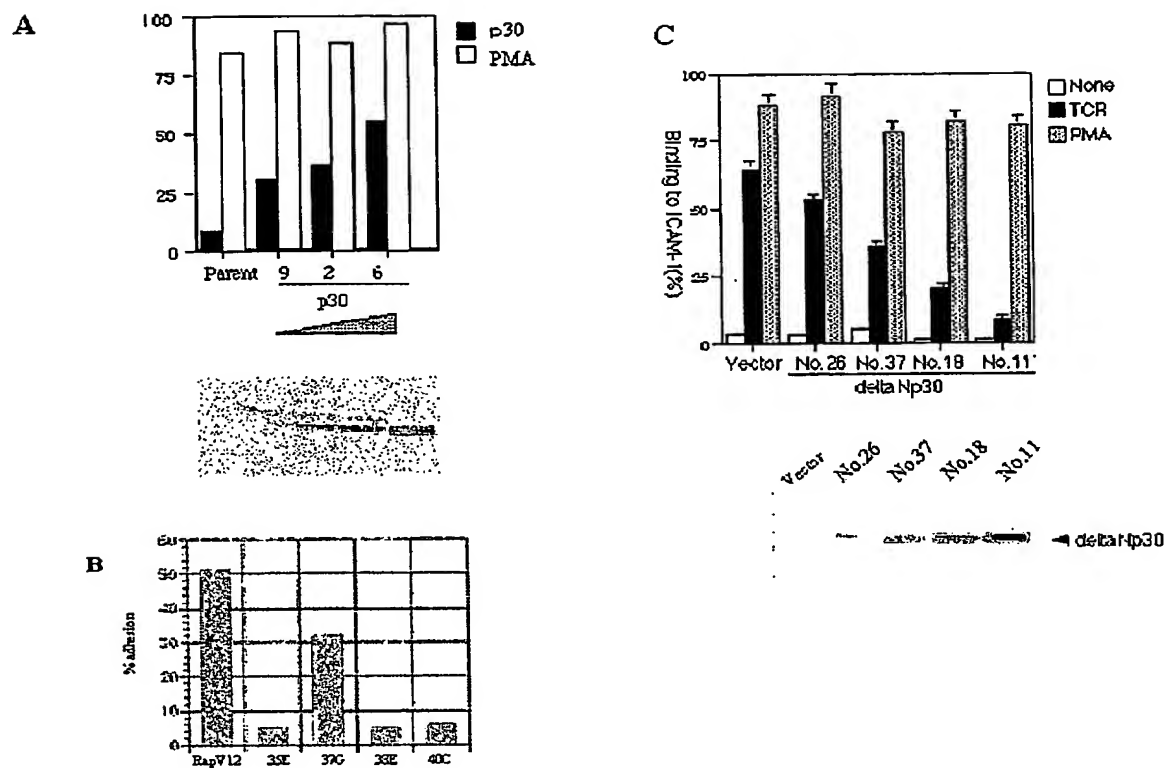
図 4

**p30 mediates Rap1-dependent migration**

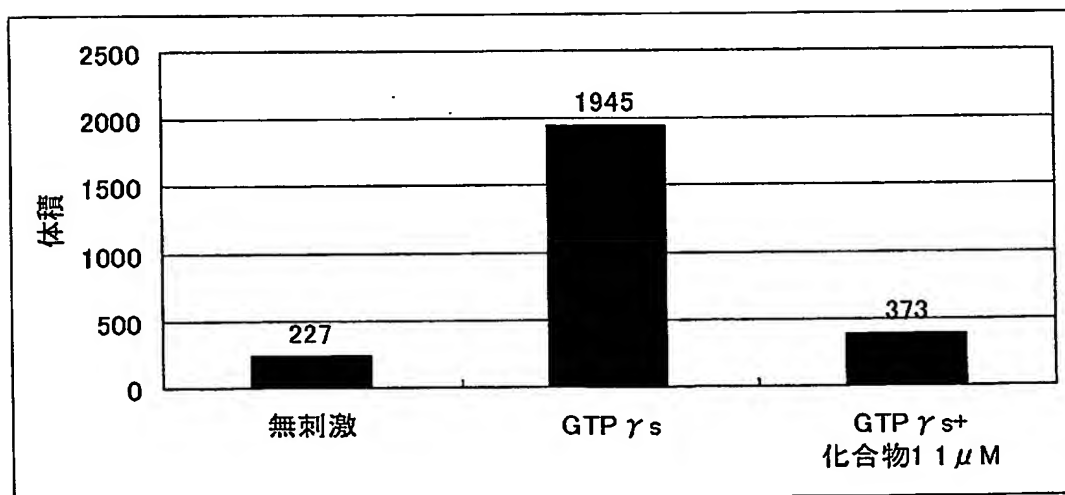
【図 5】

**Overexpression of p30 enhances SDF-1-induced migration**

【図 6】

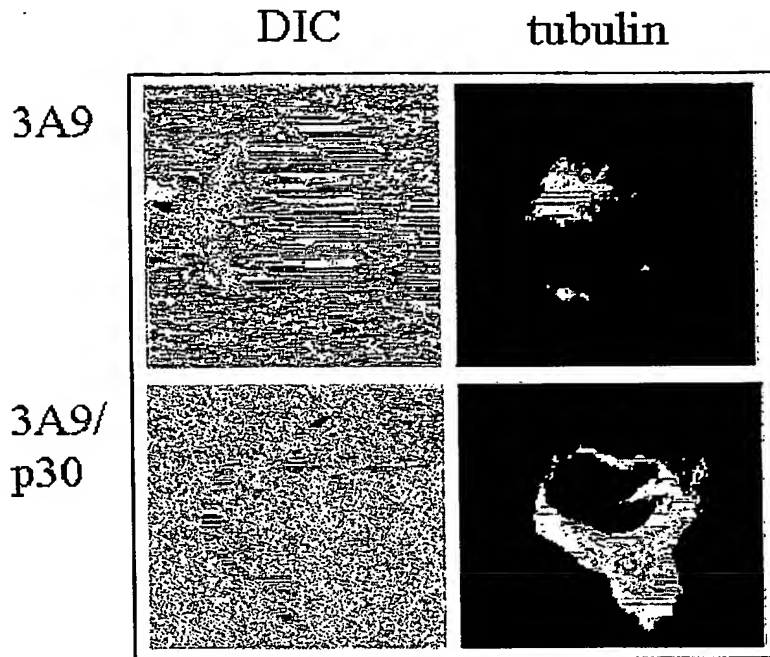


【図 7】



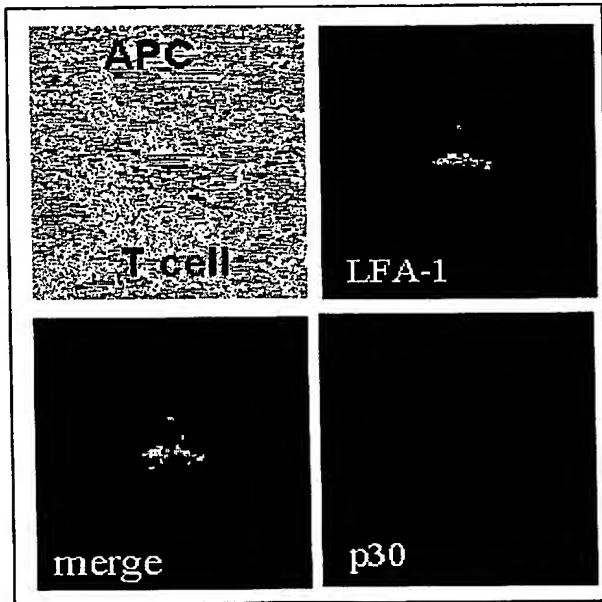
【図 8】

Microtubule development by p30



【図 9】

Accumulation of LFA-1 and p30  
at T-APC contact site



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 インテグリン接着制御分子としてのRap1の機能破綻は免疫病である炎症、アレルギー、自己免疫疾患、癌免疫、移植免疫等の病態と密接に関連していると考えられるが、Rap1によるインテグリン接着制御のメカニズムを解明することはこれらの免疫病の病態理解や治療法を開発することにつながる。

【解決手段】 Rap1によるインテグリン接着性制御に関与する分子として、p30が同定されてきているが、該p30はRap1と結合して、その機能を制御していることが見出された。この知見を利用することにより、p30とRap1との結合阻害剤などが開発でき、炎症、アレルギー、自己免疫疾患、癌免疫、移植免疫等の治療薬の開発、さらには制御機構の解明が可能となる。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-316892
受付番号	50201644568
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年10月31日

<認定情報・付加情報>

【提出日】

平成14年10月30日

次頁無

特願 2002-316892

出願人履歴情報

識別番号

[000000354]

1. 変更年月日

1993年 6月21日

[変更理由]

住所変更

住 所

大阪府大阪市西区江戸堀一丁目3番15号

氏 名

石原産業株式会社